



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 45 916 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**C 07 H 21/00**

②① Aktenzeichen: 199 45 916.9  
②② Anmeldetag: 24. 9. 1999  
④③ Offenlegungstag: 5. 4. 2001

**DE 199 45 916 A 1**

⑦① Anmelder: BioteCon Diagnostics GmbH, 10589 Berlin, DE	medizin 20 (1996) 500-503; Chem.Abstr. 125 (1996) 50197q (J. Rapid Methods Autom. Microbiol. 4 (1996) 219-233); Chem.Abstr. 124 (1996) 308709t (J. Appl. Bacteriol. 80 (1996) 244-251); Chem.Abstr. 124 (1996) 136858x (J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 3091-3095); Chem.Abstr. 123 (1995) 134255d (FEMS Microbiol. Lett. 128 (1995) 119-125); Datenbank MEDLINE AN 1998439380 (Research in Microbiology 149 (1998) 433-448); Datenbank MEDLINE AN 96034419 (J. Medical and Veterinary Mycology 33 (1995) 215-221); Datenbank MEDLINE AN 94081857 (Molecular and Biochemical Parasitology 61 (1993) 127-135); Datenbank MEDLINE AN 93292903 (FEMS Microbiol. Lett. 108 (1993) 259-263); Datenbank MEDLINE AN 93223829 (Experimental Para- sitology 76 (1993) 68-75); Datenbank MEDLINE AN 92209976 (FEMS Microbiol. Lett. 68 (1991) 307-312);
⑦④ Vertreter: Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München	
⑦② Erfinder: Grabowski, Reiner, Dr., 37075 Göttingen, DE; Berghof, Kornelia, Dr., 12355 Berlin, DE	
⑤⑥ Entgegenhaltungen: DE 197 39 611 A1 DE 197 31 292 A1 EP 7 39 988 A1 EP 4 72 434 A2 Gene 146 (1994) 57-65; Gene 132 (1993) 21-31; Gene 111 (1992) 119-124; Gene 79 (1989) 33-46; Chem.Abstr. 130 (1999) 120332j (Can. J. Microbiol. 44 (1998) 807-818); Chem.Abstr. 129 (1998) 91244d (Microbiology, Reading, U.K., 144 (1998) 1189-1196); Chem.Abstr. 125 (1996) 266832r (Laboratoriums-	

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Nukleinsäuremoleküle zum Nachweis von Bakterien und phylogenetischen Einheiten von Bakterien

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die die Identifikation von Bakterien oder Bakteriengruppen ermöglichen. Bei dem Nachweis wird die 23S/5S rRNA enthaltende Region des bakteriellen Genoms als Zielsequenz für den Bakteriennachweis eingesetzt.

**DE 199 45 916 A 1**



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

<b>Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts</b> <b>PCT1217-066</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
<b>Internationales Aktenzeichen</b> <b>PCT/ EP 00/ 08813</b>	<b>Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)</b> <b>08/09/2000</b>	<b>(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)</b> <b>24/09/1999</b>
<b>Anmelder</b>  <b>BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

•

▼



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/08813

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. -  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. -  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr. -  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

**siehe Zusatzblatt**

**Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung  
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.**

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.  
**1-74 (alle teilweise: beruht auf SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:211 und SEQ ID NO:212)**
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Angesichts der großen Zahl wie auch des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die SEQ ID NOs: 1-530.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-74 (alle teilweise)

Im Hinblick auf die Komplexität dieser Anmeldung ist es für die IRB unmöglich die Ansprüche die übereinstimmen mit den verschiedenen Erfindungen in Separaten Gruppen ein zu teilen. Daher hat die IRB entschlossen die einzelne Erfindungen an hand der 530 angegebenen Sequenzen (SEQ ID NOs:1-530) zu definieren wobei jede einzelne Sequenz mit eine Erfindung übereinstimmt.

Erfindung 1:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:1, Derivate davon, Nukleinsäuremoleküle die komplementair zu diesen sind, Nukleinsäuremoleküle die spezifisch damit hybridisieren, und Kombinationen von diesen für den Nachweis von Bakterien (Enterobakterien). Verwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

2. Ansprüche: 1-74 (alle teilweise)

Erfindung 2-530:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:2, Derivate davon, Nukleinsäuremoleküle die komplementair zu diesen sind, Nukleinsäuremoleküle die spezifisch damit hybridisieren, und Kombinationen von diesen für den Nachweis von Bakterien (Enterobakterien). Verwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

Ebenso für die Erfindungen 3-540 aber begrenzt auf SEQ ID NO:3-530.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 00/08813

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 39 611 A (BIOTEC ON GES FUER BIOTECHNOLOG) 11 March 1999 (1999-03-11) page 4, line 49 -page 5, line 18; claims 1,2	1-74
	---	
X	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 October 1996 (1996-10-30) claims 1-9	1-74
	---	
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6 November 1997 (1997-11-06) claims 1-12	1-74
	---	
X	DE 197 31 292 A (BIOTEC ON GES FUER BIOTECHNOLOG) 28 January 1999 (1999-01-28) claim 1	1-74
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2002

Date of mailing of the international search report

08. 02. 2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriels, J





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08813

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 13396 A (FLUIT ADRIAAN CAMILLE ;WIDJOJOATMODJO MYRA NOORELY (NL); U GENE RE) 18 May 1995 (1995-05-18) claims 1-4 ---	1-74
X	WO 93 11264 A (DU PONT) 10 June 1993 (1993-06-10) page 11, line 5 -page 14, line 4 ---	1-74
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13 December 1990 (1990-12-13) Probe 1256 is part of SEQ ID NO:1 of the present application page 15, line 31; claims 3-5,36,48; tables 3,4 ---	1-74
X	BLATTNER FREDERICK R ET AL: "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 277, no. 5331, 1997, pages 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075 100 % SEQ ID NO:1 the whole document ---	1-74
X	ANTON ANA I ET AL: "Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 9, May 1999 (1999-05), pages 2703-2709, XP002179168 ISSN: 0021-9193 AF053966 is for 99 % similar to SEQ ID NO:1 the whole document ---	1-74
X	US 5 776 680 A (LEIBOWITZ MICHAEL J ET AL) 7 July 1998 (1998-07-07) SEQ ID NO 14 has 90% homology with SEQ ID NO 211 of the present application. claim 1 ---	1-74
A	BRENNER D J ET AL: "CONSERVATION OF TRANSFER RNA AND 5S RNA CISTRONS IN ENTEROBACTERIACEAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 129, no. 3, 1977, pages 1435-1439, XP002082055 ISSN: 0021-9193 page 1436, right-hand column -page 1439, left-hand column -----	1-74



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08813

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19739611	A	11-03-1999	DE 19739611 A1	11-03-1999
			AU 9538798 A	29-03-1999
			WO 9912949 A2	18-03-1999
			EP 1012156 A2	28-06-2000
			JP 2001515710 T	25-09-2001
EP 0739988	A	30-10-1996	DE 19515891 A1	31-10-1996
			EP 0739988 A1	30-10-1996
			JP 9107998 A	28-04-1997
			US 6194145 B1	27-02-2001
DE 19616750	A	06-11-1997	DE 19616750 A1	06-11-1997
			AU 2888497 A	19-11-1997
			WO 9741253 A1	06-11-1997
DE 19731292	A	28-01-1999	DE 19731292 A1	28-01-1999
			AU 1847099 A	16-02-1999
			WO 9905159 A2	04-02-1999
			EP 0998483 A2	10-05-2000
			JP 2001510688 T	07-08-2001
WO 9513396	A	18-05-1995	NL 9301957 A	01-06-1995
			WO 9513396 A2	18-05-1995
WO 9311264	A	10-06-1993	AT 165622 T	15-05-1998
			AU 3148593 A	28-06-1993
			CA 2125141 A1	10-06-1993
			DE 69225333 D1	04-06-1998
			DE 69225333 T2	24-09-1998
			EP 0620862 A1	26-10-1994
			ES 2114957 T3	16-06-1998
			HK 1006063 A1	05-02-1999
			JP 7501699 T	23-02-1995
			LT 1511 A	26-06-1995
			LV 10311 A ,B	20-10-1994
			MX 9206974 A1	01-06-1993
			WO 9311264 A1	10-06-1993
			US 5753467 A	19-05-1998
WO 9015157	A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
			AU 5950690 A	07-01-1991
			CA 2031499 A1	01-12-1990
			DE 69022180 D1	12-10-1995
			DE 69022180 T2	01-02-1996
			EP 0431149 A1	12-06-1991
			JP 4500315 T	23-01-1992
			WO 9015157 A1	13-12-1990
			US 5401631 A	28-03-1995
US 5776680	A	07-07-1998	US 5849484 A	15-12-1998



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/023606 A3(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08813

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. September 2000 (08.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 45 916.9 24. September 1999 (24.09.1999) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE];  
Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRABOWSKI, Reiner  
[DE/DE]; Theodor-Heuss-Str. 39, 37075 Göttingen (DE).  
BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländer Weg 85,  
12355 Berlin (DE).(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCK-  
MAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstr. 58,  
80538 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 6. September 2002Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

RECEIVED

OCT 07 2002

TECH CENTER 1600/2900

WO 01/023606 A3

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES FOR DETECTING BACTERIA AND PHYLOGENETIC UNITS OF BACTERIA

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN UND PHYLOGENETISCHEN EIN-  
HEITEN VON BAKTERIEN(57) Abstract: The present invention relates to nucleic acid molecules which allow the identification of bacteria or bacteria groups.  
The region containing 23S/5S rRNA and pertaining to the bacterial genome is used as the target sequence for detecting the bacteria.(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die die Identifikation von Bakterien oder Bak-  
teriengruppen ermöglichen. Bei dem Nachweis wird die 23S/5S rRNA enthaltende Region des bakteriellen Genoms als Zielsequenz  
für den Bakteriennachweis eingesetzt.



101088966

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 05 JUN 2002

WIPO PCT

PCT

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

10

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1217-066	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08813	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  19/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  31.05.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  BROCHADO GARGANTA, M  Tel. Nr. +49 89 2399 8935 





**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-60                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-74                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/8-8/8                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-86, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen



Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,       Seiten:
- ☐ Ansprüche,         Nr.:
- ☐ Zeichnungen,       Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1-18, 30, 71-74 (all partially), 19-29, 31-70 (all completely).

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
  - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
  - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
  - ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1-18, 30, 71-74 (all partially), 19-29, 31-70 (all completely) wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:



- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☐ alle Teile.
- ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1-18,30,71-74 (all partially) beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-18,30,71-74
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-18,30,71-74
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-18,30,71-74
	Nein: Ansprüche	



2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**





**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Keine Erstellung eines Gutachtens für die Ansprüche 1-74 (alle teilweise) findet in diesem Bericht statt, da nur die Ansprüche, die auf SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 211 and SEQ ID NO: 212 beruhen, recherchiert wurden.
2. Ansprüche 19-29 und 31-70 beziehen sich nicht auf die recherchierten Sequenzen (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:211 und SEQ ID NO: 212) und deshalb können nicht geprüft werden.

**Zu Punkt IV**

**Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung 530 (Gruppen von) Erfindungen enthält. Der Anmelder hat einige (zwei) der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig eintrichert. Dieser Prüfungsbericht bezieht sich deshalb auf die Ansprüche, die recherchiert wurden (1-74, alle teilweise), bzw. Erfindungen 1, 211 und 212.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

(A) DE 197 39 611 A

(B) EP-A-0 739 988



(C) DE 196 16 750 A

(D) DE 197 31 292 A

## 2. Neuheit

- 2.1 Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT, da das beanspruchte Nukleinsäuremoleküle schon in Dokumenten A, B, C und D offenbart ist. Aus dem gleichen Grund ist der Gegenstand von Anspruch 71 auch nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

Dokument A offenbart Nukleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von Bakterien, dadurch gewinnbar, dass man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien angehören (siehe Anspruch 1, Seiten 5-6).

Dokument B offenbart doppelsträngige *Legionella*-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23S-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschliessen (siehe Anspruch 19 und SEQ ID NO: 1-68).

Dokument C offenbart ein Verfahren zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer die interessierenden Mikroorganismen enthaltenen Probe, mittels molekularbiologischen Techniken (siehe Anspruch 1 ).

Dokument D offenbart ein Nukleinsäuremolekül und Verwendung dieses Moleküls zum Nachweis von Mikroorganismen (siehe Ansprüche 1, 5 and 12-17).

Die Merkmale der abhängigen Ansprüche 2-4 sind auch in diesen Dokumenten offenbart (siehe Dokument A: Seiten 3-5; Dokument B: Seiten 7-14; Dokument C: Seiten 2-4; Dokument D: Seiten 3-5), und deshalb sind diese Ansprüche nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.

- 2.2 Der Gegenstand von Ansprüchen 5 und 72-73 bezieht sich auf eine Kombination von



bekannten Nukleinsäuren, und ist aus den in 2.1 beschriebenen Gründen auch nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

2.3 Ansprüche 6, 7-10, 11-18, 30 und 74, die ein Kit enthaltend das/die beanspruchte/n Nukleinsäuremolekül/e, ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien und zur Amplifikation bakterieller DNA und die Verwendung den beanspruchten Nukleinsäuren zum Nachweis von Bakterien beanspruchen, sind auch nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT, siehe:

- Dokument A: Ansprüche 15-22
- Dokument B: Ansprüche 1-13 und 20
- Dokument C: Ansprüche 1-12
- Dokument D: Ansprüche 11-18



International application No.

PLI/EP 00/08813

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 39 611 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 11. März 1999 (1999-03-11) Page 4, Line 49 - Page 5, Line 18; Claims 1, 2	1-74
X	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30th October 1996 (30.10.1996) Claims 1-9	1-74
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6. November 1997 (1997-11-06) Claims 1-12	1-74
X	DE 197 31 292 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 28th January 1999 (28.01.1999) Claim 1	1-74
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

**X** See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"**T** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**31st January 2002 (31.01.2002)**

Date of mailing of the international search report

8th February 2002 (08.02.2002)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Gabriels, J

Facsimile No.

Telephone No. \_\_\_\_\_

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08813

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 13396 A (FLUIT ADRIAAN CAMILLE ;WIDJOJOATMODJO MYRA NOORELY (NL); U GENE RE) 18th May 1995 (18.05.1995) Claims 1-4	1-74
X	WO 93 11264 A (DU PONT) 10th June 1993 (10.06.1993) Page 11, Line 5 - Page 14, Line 4	1-74
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13th December 1990 (13.12.1990) Probe 1256 is part of SEQ ID NO:1 of the present application Page 15, Line 31; Claims 3-5, 36, 48; Tables 3, 4	1-74
X	BLATTNER FREDERICK R ET AL: "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." SCIENCE (WASHINGTON D C), Bd. 277, Nr. 5331, 1997, Pages 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075 100 % SEQ ID NO:1 the whole document	1-74
X	ANTON ANA I ET AL: "Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 181, Nr. 9, May 1999 (1999-05), Seiten 2703-2709, XP002179168 ISSN: 0021-9193 AF053966 is for 99 % similar to SEQ ID NO:1 the whole document	1-74
X	US 5 776 680 A (LEIBOWITZ MICHAEL J ET AL) 7. July 1998 (1998-07-07) SEQ ID NO 14 has 90% homology with SEQ ID NO 211 of the present application. Claim 1	1-74
A	BRENNER D J ET AL: "CONSERVATION OF TRANSFER RNA AND 5S RNA CISTRONS IN ENTEROBACTERIACEAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 129, Nr. 3, 1977, Pages 1435-1439, XP002082055 ISSN: 0021-9193 Page 1436, Right-hand column 1439, Left-hand column	1-74



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PLI/EP 00/08813

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet  
No additional fees are to be reimbursed on the basis of the result of the international preliminary examination according to PCT rule 40.2 (e).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
1-74 (all in part : based on SEQ ID NO.1, SEQ ID NO. 211 and SEQ ID NO. 212)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Pr test



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

In view of the large number and the wording of the present patent claims which make it difficult if not impossible to determine the desired scope of protection, the present patent application fails to correspond to the requirements of PCT article 6 (cf. also PCT rule 6.1(a)) to such an extent that a meaningful search cannot be carried out. For this reason, the search was directed at parts of the patent claims which seem to be supported and disclosed in the above-mentioned sense, i.e. parts relating to SEQ ID NOS. 1-530.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this international application contains multiple (groups of inventions), as follows :

## 1. Claims Nos. 1-74

In view of the complexity of this application it is impossible for the ISA to divide the claims corresponding to the various inventions into separate groups. As a result, the ISA decided to define the individual inventions by means of the 530 cited sequences (SEQ ID NOS. 1-530), each individual sequence corresponding to an invention.

## Invention 1 :

Nucleic acid molecule as a probe or primer according to SEQ ID NO. 1, derivatives thereof, nucleic acid molecules complementary thereto, nucleic acids which hybridize specifically therewith, and combinations thereof for the detection of bacteria (endobacteria). Uses, methods and kits using or containing said nucleic acids.

## 2. Claims Nos. 1-74 (all in part)

## Invention 2

A nucleic acid molecule as a probe or primer according to SEQ ID NO. 2, derivatives thereof, nucleic acid molecules complementary thereto, nucleic acids which hybridize specifically therewith, and combinations thereof for the detection of bacteria (endobacteria). Uses, methods and kits using or containing said nucleic acids.

Idem for inventions 3-530 but limited to SEQ ID NO.3-530.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP00/08813

Patent document cited in search report		Publication dat	Patent familiy member(s)	Publication date
DE 19739611	A	11-03-1999	DE 19739611 A1	11-03-1999
			AU 9538798 A	29-03-1999
			WO 9912949 A2	18-03-1999
			EP 1012156 A2	28-06-2000
			JP 2001515710 T	25-09-2001
EP 0739988	A	30-10-1996	DE 19515891 A1	31-10-1996
			EP 0739988 A1	30-10-1996
			JP 9107998 A	28-04-1997
			US 6194145 B1	27-02-2001
DE 19616750	A	06-11-1997	DE 19616750 A1	06-11-1997
			AU 2888497 A	19-11-1997
			WO 9741253 A1	06-11-1997
DE 19731292	A	28-01-1999	DE 19731292 A1	28-01-1999
			AU 1847099 A	16-02-1999
			WO 9905159 A2	04-02-1999
			EP 0998483 A2	10-05-2000
			JP 2001510688 T	07-08-2001
WO 9513396	A	18-05-1995	NL 9301957 A	01-06-1995
			WO 9513396 A2	18-05-1995
WO 9311264	A	10-06-1993	AT 165622 T	15-05-1998
			AU 3148593 A	28-06-1993
			CA 2125141 A1	10-06-1993
			DE 69225333 D1	04-06-1998
			DE 69225333 T2	24-09-1998
			EP 0620862 A1	26-10-1994
			ES 2114957 T3	16-06-1998
			HK 1006063 A1	05-02-1999
			JP 7501699 T	23-02-1995
			LT 1511 A	26-06-1995
			LV 10311 A ,B	20-10-1994
			MX 9206974 A1	01-06-1993
			WO 9311264 A1	10-06-1993
			US 5753467 A	19-05-1998
WO 9015157	A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
			AU 5950690 A	07-01-1991
			CA 2031499 A1	01-12-1990
			DE 69022180 D1	12-10-1995
			DE 69022180 T2	01-02-1996
			EP 0431149 A1	12-06-1991
			JP 4500315 T	23-01-1992
			WO 9015157 A1	13-12-1990
			US 5401631 A	28-03-1995
US 5776680	A	07-07-1998	US 5849484 A	15-12-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int nales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08813

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 197 39 611 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 11. März 1999 (1999-03-11) Seite 4, Zeile 49 -Seite 5, Zeile 18; Ansprüche 1,2 ---	1-74
X	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 (1996-10-30) Ansprüche 1-9 ---	1-74
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6. November 1997 (1997-11-06) Ansprüche 1-12 ---	1-74
X	DE 197 31 292 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 28. Januar 1999 (1999-01-28) Anspruch 1 ---	1-74
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08. 02. 2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gabriels, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 13396 A (FLUIT ADRIAAN CAMILLE ;WIDJOJOATMODJO MYRA NOORELY (NL); U GENE RE) 18. Mai 1995 (1995-05-18) Ansprüche 1-4 ---	1-74
X	WO 93 11264 A (DU PONT) 10. Juni 1993 (1993-06-10) Seite 11, Zeile 5 -Seite 14, Zeile 4 ---	1-74
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13. Dezember 1990 (1990-12-13) Probe 1256 is part of SEQ ID NO:1 of the present application Seite 15, Zeile 31; Ansprüche 3-5,36,48; Tabellen 3,4 ---	1-74
X	BLATTNER FREDERICK R ET AL: "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." SCIENCE (WASHINGTON D C), Bd. 277, Nr. 5331, 1997, Seiten 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075 100 % SEQ ID NO:1 das ganze Dokument ---	1-74
X	ANTON ANA I ET AL: "Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 181, Nr. 9, Mai 1999 (1999-05), Seiten 2703-2709, XP002179168 ISSN: 0021-9193 AF053966 is for 99 % similar to SEQ ID NO:1 das ganze Dokument ---	1-74
X	US 5 776 680 A (LEIBOWITZ MICHAEL J ET AL) 7. Juli 1998 (1998-07-07) SEQ ID NO 14 has 90% homology with SEQ ID NO 211 of the present application. Anspruch 1 ---	1-74
A	BRENNER D J ET AL: "CONSERVATION OF TRANSFER RNA AND 5S RNA CISTRONS IN ENTEROBACTERIACEAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 129, Nr. 3, 1977, Seiten 1435-1439, XP002082055 ISSN: 0021-9193 Seite 1436, rechte Spalte -Seite 1439, linke Spalte -----	1-74

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/08813

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche k in Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

**siehe Zusatzblatt**

**Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung  
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.**

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die  
Ansprüche Nr.  
**1-74 (alle teilweise: beruht auf SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:211 und SEQ ID NO:212)**
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich ein Widerspruchs

☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgt ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Angesichts der großen Zahl wie auch des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die SEQ ID NOs: 1-530.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-74 (alle teilweise)

Im Hinblick auf die Komplexität dieser Anmeldung ist es für die IRB unmöglich die Ansprüche die übereinstimmen mit den verschiedenen Erfindungen in Separaten Gruppen ein zu teilen. Daher hat die IRB entschlossen die einzelne Erfindungen an hand der 530 angegebenen Sequenzen (SEQ ID NOs:1-530) zu definieren wobei jede einzelne Sequenz mit eine Erfindung übereinstimmt.

Erfindung 1:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:1, Derivate davon, Nukleinsäuremoleküle die komplementair zu diesen sind, Nukleinsäuremoleküle die spezifisch damit hybridisieren, und Kombinationen von diesen für den Nachweis von Bakterien (Enterobakterien). Verwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

2. Ansprüche: 1-74 (alle teilweise)

Erfindung 2:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:2, Derivate davon, Nukleinsäuremoleküle die komplementair zu diesen sind, Nukleinsäuremoleküle die spezifisch damit hybridisieren, und Kombinationen von diesen für den Nachweis von Bakterien (Enterobakterien). Verwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

Ebenso für die Erfindungen 3-530 aber begrenzt auf SEQ ID NO:3-530.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen

PC1/EP 00/08813

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19739611 A	11-03-1999	DE 19739611 A1 AU 9538798 A WO 9912949 A2 EP 1012156 A2 JP 2001515710 T	11-03-1999 29-03-1999 18-03-1999 28-06-2000 25-09-2001
EP 0739988 A	30-10-1996	DE 19515891 A1 EP 0739988 A1 JP 9107998 A US 6194145 B1	31-10-1996 30-10-1996 28-04-1997 27-02-2001
DE 19616750 A	06-11-1997	DE 19616750 A1 AU 2888497 A WO 9741253 A1	06-11-1997 19-11-1997 06-11-1997
DE 19731292 A	28-01-1999	DE 19731292 A1 AU 1847099 A WO 9905159 A2 EP 0998483 A2 JP 2001510688 T	28-01-1999 16-02-1999 04-02-1999 10-05-2000 07-08-2001
WO 9513396 A	18-05-1995	NL 9301957 A WO 9513396 A2	01-06-1995 18-05-1995
WO 9311264 A	10-06-1993	AT 165622 T AU 3148593 A CA 2125141 A1 DE 69225333 D1 DE 69225333 T2 EP 0620862 A1 ES 2114957 T3 HK 1006063 A1 JP 7501699 T LT 1511 A LV 10311 A ,B MX 9206974 A1 WO 9311264 A1 US 5753467 A	15-05-1998 28-06-1993 10-06-1993 04-06-1998 24-09-1998 26-10-1994 16-06-1998 05-02-1999 23-02-1995 26-06-1995 20-10-1994 01-06-1993 10-06-1993 19-05-1998
WO 9015157 A	13-12-1990	AT 127530 T AU 5950690 A CA 2031499 A1 DE 69022180 D1 DE 69022180 T2 EP 0431149 A1 JP 4500315 T WO 9015157 A1 US 5401631 A	15-09-1995 07-01-1991 01-12-1990 12-10-1995 01-02-1996 12-06-1991 23-01-1992 13-12-1990 28-03-1995
US 5776680 A	07-07-1998	US 5849484 A	15-12-1998

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 June 2001 (22.06.01)	
International application No. PCT/EP00/08813	Applicant's or agent's file reference PCT1217-066
International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
Applicant GRABOWSKI, Reiner et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

19 March 2001 (19.03.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Odile ALIU
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 197 39 611 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 11. März 1999 (1999-03-11) Seite 4, Zeile 49 -Seite 5, Zeile 18; Ansprüche 1,2 ---	1-74
X	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 (1996-10-30) Ansprüche 1-9 ---	1-74
X	DE 196 16 750 A (NEULAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6. November 1997 (1997-11-06) Ansprüche 1-12 ---	1-74
X	DE 197 31 292 A (BIOTECON GES FUER BIOTECHNOLOG) 28. Januar 1999 (1999-01-28) Anspruch 1 ---	1-74
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Januar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08. 02. 2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gabriels, J



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 13396 A (FLUIT ADRIAAN CAMILLE ;WIDJOJOATMODJO MYRA NOORELY (NL); U GENE RE) 18. Mai 1995 (1995-05-18) Ansprüche 1-4 ---	1-74
X	WO 93 11264 A (DU PONT) 10. Juni 1993 (1993-06-10) Seite 11, Zeile 5 -Seite 14, Zeile 4 ---	1-74
X	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13. Dezember 1990 (1990-12-13) Probe 1256 is part of SEQ ID NO:1 of the present application Seite 15, Zeile 31; Ansprüche 3-5,36,48; Tabellen 3,4 ---	1-74
X	BLATTNER FREDERICK R ET AL: "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." SCIENCE (WASHINGTON D C), Bd. 277, Nr. 5331, 1997, Seiten 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075 100 % SEQ ID NO:1 das ganze Dokument ---	1-74
X	ANTON ANA I ET AL: "Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in Escherichia coli." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 181, Nr. 9, Mai 1999 (1999-05), Seiten 2703-2709, XP002179168 ISSN: 0021-9193 AF053966 is for 99 % similar to SEQ ID NO:1 das ganze Dokument ---	1-74
X	US 5 776 680 A (LEIBOWITZ MICHAEL J ET AL) 7. Juli 1998 (1998-07-07) SEQ ID NO 14 has 90% homology with SEQ ID NO 211 of the present application. Anspruch 1 ---	1-74
A	BRENNER D J ET AL: "CONSERVATION OF TRANSFER RNA AND 5S RNA CISTRONS IN ENTEROBACTERIACEAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 129, Nr. 3, 1977, Seiten 1435-1439, XP002082055 ISSN: 0021-9193 Seite 1436, rechte Spalte -Seite 1439, linke Spalte -----	1-74





# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08813

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19739611 A	11-03-1999	DE 19739611 A1	11-03-1999
		AU 9538798 A	29-03-1999
		WO 9912949 A2	18-03-1999
		EP 1012156 A2	28-06-2000
		JP 2001515710 T	25-09-2001
EP 0739988 A	30-10-1996	DE 19515891 A1	31-10-1996
		EP 0739988 A1	30-10-1996
		JP 9107998 A	28-04-1997
		US 6194145 B1	27-02-2001
DE 19616750 A	06-11-1997	DE 19616750 A1	06-11-1997
		AU 2888497 A	19-11-1997
		WO 9741253 A1	06-11-1997
DE 19731292 A	28-01-1999	DE 19731292 A1	28-01-1999
		AU 1847099 A	16-02-1999
		WO 9905159 A2	04-02-1999
		EP 0998483 A2	10-05-2000
		JP 2001510688 T	07-08-2001
WO 9513396 A	18-05-1995	NL 9301957 A	01-06-1995
		WO 9513396 A2	18-05-1995
WO 9311264 A	10-06-1993	AT 165622 T	15-05-1998
		AU 3148593 A	28-06-1993
		CA 2125141 A1	10-06-1993
		DE 69225333 D1	04-06-1998
		DE 69225333 T2	24-09-1998
		EP 0620862 A1	26-10-1994
		ES 2114957 T3	16-06-1998
		HK 1006063 A1	05-02-1999
		JP 7501699 T	23-02-1995
		LT 1511 A	26-06-1995
		LV 10311 A ,B	20-10-1994
		MX 9206974 A1	01-06-1993
		WO 9311264 A1	10-06-1993
		US 5753467 A	19-05-1998
WO 9015157 A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
		AU 5950690 A	07-01-1991
		CA 2031499 A1	01-12-1990
		DE 69022180 D1	12-10-1995
		DE 69022180 T2	01-02-1996
		EP 0431149 A1	12-06-1991
		JP 4500315 T	23-01-1992
		WO 9015157 A1	13-12-1990
		US 5401631 A	28-03-1995
US 5776680 A	07-07-1998	US 5849484 A	15-12-1998



in at least two distinct transcripts and possibly two different proteins. Compared with pro-mAKAP82, considerably less pro-hAKAP82 was processed to hAKAP82 in human sperm. Although pro-mAKAP82 localizes only to the proximal portion of the principal piece of the flagellum, pro-hAKAP82 localized to the entire length of the principal piece. The pro-hAKAP82 gene mapped to human chromosome Xp11.2, indicating that defects in this gene are maternally inherited. These studies suggest several roles for hAKAP82 in sperm motility, including the regulation of signal transduction pathways.

**130:120329p C-myc amplification in daunorubicin resistant HL-60 cells.** Shin, Eun Hee; Kim, Su Young; Chung, Hai Won (School of Public Health, Seoul National University, Seoul, 110-460 S. Korea). *Korean J. Genet.* 1998, 20(1), 59-67 (Korean). Genetics Society of Korea. Gene amplification is known to be usually associated with development or progression of cancer cell. At the cytogenetic level, amplification is detected as sep. chromatic body i.e. double minutes (DM), or as chromosomal region lacking the characteristic banding pattern and appearing as either homogeneously staining region (HSR), or abnormal banded region (ABR). An human promyelocytic leukemia cell line, HL-60, was exposed to daunorubicin and resistant cell line was selected. In order to investigate whether the gene amplification is associated with drug resistance, the resistant cell line was analyzed for c-myc amplification using FISH technique. In addition to the c-myc band on the original position of chromosome 8q24, one to three thick amplified c-myc bands, which were presumed to be homogeneously staining regions, were also found on other location. The total no. of amplified c-myc bands was increased in daunorubicin resistant HL-60 cells. In daunorubicin resistant HL-60 cells, more than two amplified c-myc bands were detected, but in normal HL-60 cells, which were not treated with daunorubicin, no bands were found. The total no. of c-myc signal was increased in daunorubicin resistant HL-60 cells compared with control HL-60 cells. The frequency of cells with 3 c-myc bands, was 20% in daunorubicin resistant HL-60 cells whereas only 3% in control HL-60 cells and 0.7% in normal lymphocyte, resp. Our results suggest that c-myc amplification may be associated with daunorubicin resistance in HL-60 cells.

**130:120330g Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus Kluyveromyces.** Belloch, Carmela; Barrio, Eladio; Garcia, M. Dolores; Querol, Amparo (Colección Española de Cultivos Tipo, Univ. de Valencia, Spain). *Yeast* 1998, 14(15), 1341-1354 (Eng). John Wiley & Sons Ltd. The analysis of the electrophoretic chromosome patterns of the species of the genus *Kluyveromyces*, reveals a high polymorphism in size, no. and intensity of bands. Different sets of electrophoresis running conditions were used to establish species-specific patterns and also to detect intraspecific variation. According to their karyotypes, the species of this genus can be divided into two major groups. The first group includes the species *K. africanus*, *K. bacilliformis*, *K. delphensis*, *K. lodderae*, *K. phaffii*, *K. polysporus* and *K. yarrowii*, composing the so-called 'Saccharomyces cerevisiae'-like group, because their karyotypes resemble that of the species *S. cerevisiae*. The second group comprises the species *K. aestuarii*, *K. blattae*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans*, *K. waltii* and *K. wickerhamii*, whose chromosomal patterns exhibit common characteristics very different to those of the species included in the 'Saccharomyces cerevisiae'-like group. This division is concordant with the position of these species in previous phylogenetic reconstructions. Additionally, the intraspecific analysis of the chromosome patterns show a rich polymorphism in the heterogenous species *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, and *K. marxianus*, which is in concordance with the variability observed with other phenotypic or genetic markers. On the contrary, *K. thermotolerans* exhibits a homogeneous karyotype indicative of a very low level of chromosomal polymorphism, which is congruent with the reduced variability found in this species with other molecular markers.

**130:120331b Isolation and sequence analysis of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (URA3) of *Candida utilis*.** Comparison with the OMP decarboxylase gene family. Rodriguez, Luis; Chavez, Francisco P.; Gonzalez, Maria E.; Basabe, Liliana; Rivero, Tanilo (Bioindustry Division, Center for Genetic Eng. Biotechnology, Havana, Cuba). *Yeast* 1998, 14(15), 1399-1406 (Eng). John Wiley & Sons Ltd. The URA3 gene of *Candida utilis* encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase enzyme was isolated by complementation in *Escherichia coli* pyrF mutation. The deduced amino acid sequence is highly similar to that of the Ura3 proteins from other yeast and fungal species. An extensive analysis of the family of orotidine-5'-phosphate decarboxylase is shown. The URA3 gene of *C. utilis* was able to complement functionally the ura3 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. The sequence presented here has been deposited in the EMBL data library under Accession No. Y12660.

**130:120332j Studies on the large subunit rRNA genes and their flanking regions of leuconostoc.** Nour, Mohamed (Université de Nancy-I, Laboratoire d'enzymologie et de génie génétique, Unité de recherche associée - Centre national de la recherche scientifique 457, rue de l'Université, 54000 Nancy, France). *National Research Council of Canada*. The 16S-23S (spacer-1) and 26S-5S (spacer-2) rRNA intergenic spacer regions of *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* were amplified by polymerase chain reactions and sequenced. The 23S rRNA genes of *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* were also sequenced. The RNase III-like and RNase E processing sites, as well as putative antitermination signals, were identified

within the spacer regions. A single tRNA<sup>Ala</sup> gene without the 3'-terminal CCA sequence was found in spacer-1 regions. Secondary structure models are proposed showing interactions between the two spacer regions of leuconostoc. For all strains studied, spacer-1 and spacer-2 were highly conserved and therefore could not be directly used for strain typing. Sequence information on 23S rRNA genes from leuconostoc species allowed the determination of regions that can be used as targets for diagnostic probes and amplification primers. Secondary structures of variable helical elements of leuconostoc 23S rRNA were constructed and their primary structures were compared with those of several Gram-positive bacteria with low G+C contents. Comparative analysis revealed that restriction analysis of 23S rRNA variable regions appeared to be sufficient for the search for species-specific signatures. Our experimental observations revealed that one form of the rRNA operons was present in leuconostoc. We have also demonstrated the direct linkage between the three species of rRNA genes, which are organized as follows: 5'-16S rRNA - spacer-1 - tRNA<sup>Ala</sup> - 23S rRNA - spacer-2 - 5S rRNA-3'.

**130:120333k Characteristics of hypervariable regions of mitochondrial DNA in Korean population.** Han, Jae Seok; Lee, Dong Hoon; Rho, Hyune Mo (Department of Molecular Biology and Research Center for Cell Differentiation, Seoul National University, Seoul, 151-742 S. Korea). *J. Biochem. Mol. Biol.* 1998, 31(6), 604-606 (Eng). Springer-Verlag Singapore Pte. Ltd. The nucleotide sequence of two hypervariable regions of the D-loop and the frequency of the 9-bp repeat in the region V of mitochondrial DNA (mtDNA) were investigated in the Korean population. Alignment of these sequences with the published reference revealed a unique pattern of base substitution and deletion compared with those of other races. The deletion and addition frequency of the 9-bp repeat in the region V was also distinct.

**130:120334m Mapping of members of the low-copy-number repetitive DNA sequence family chAB4 within the p arms of human acrocentric chromosomes: characterization of Robertsonian translocations.** Kehr-er-Sawatzki, Hildegard; Wöhr, Gudrun; Schempp, Werner; Eisenbarth, Ingrid; Barbi, Gotthold; Assum, Gunter (Abteilung Humangenetik, Universität Ulm, 89070 Ulm, Germany). *Chromosome Res.* 1998, 6(6), 429-435 (Eng). Rapid Science Publishers. Members of the long-range, low-copy-number repetitive DNA sequence family chAB4 are located on nine different human chromosome pairs and the Y chromosome, i.e. on the short arms of all the acrocentrics. To localize the chAB4 sequences more precisely on the acrocentrics, chAB4-specific probes together with rDNA and a no. of satellite sequences were hybridized to metaphase chromosomes of normal probands and of carriers of Robertsonian translocations of the frequent types rob(13q14q) and rob(14q21q). The results demonstrate that chAB4 is located on both sides of the rDNA on all the acrocentrics; the exact location, however, may be chromosome specific. Chromosome 22, most probably, is the only chromosome where chAB4 is found in the direct neighborhood of the centromere. Fluorescence in situ hybridization analyses of metaphase chromosomes of carriers of rob(21q22q) revealed breakpoint diversity for this rare type of Robertsonian translocation chromosome. A direct involvement of chAB4 sequences in recombination processes leading to the Robertsonian translocations analyzed in this study can be excluded.

**130:120335n Molecular cloning of a novel glutelin cDNA from rice seeds.** Mitsukawa, Norihito; Hayashi, Hirofumi; Yamamoto, Kayo; Kido, Kunimoto; Konishi, Ryochi; Masumura, Takehiro; Tanaka, Kunisuke (Fac. Agric., Kyoto Prefect. Univ., Kyoto, Japan 606-8522). *Plant Biotechnol. (Tokyo)* 1998, 15(4), 205-211 (Eng). Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology. A novel glutelin gene was cloned from a cDNA library of maturing rice seeds (*Oryza sativa* cv. Nipponbare). The 2.0-kbp insert contained an open reading frame encoding a 510-amino acid polypeptide (M<sub>r</sub> 57,116). This novel glutelin shares 46-49% amino acid identity with previously identified rice glutelins. Phylogenetic analysis of cloned glutelins indicates that this gene constitutes a new, 5th class of glutelin gene families. The Asn-Gly processing sequence which is highly conserved in 11S seed storage proteins is replaced by Asn-Val in the sequence of the novel glutelin. The amino acid composition extending 50 residues both upstream and downstream of the Asn-Val site was less hydrophilic than in other glutelins. The N-terminal half corresponding to the acidic domains of other glutelins possesses a higher pI value (7.46) than found in other glutelins. Expression of the gene was detected in maturing seeds, but not in roots or leaves.

**130:120336p DNA bend sites in the promoter region of the human estrogen receptor gene.** Kuwabara, Kentaro; Sakuma, Yasuo (Dep. Physiol., Nippon Med. Sch., Tokyo, Japan 113-8602). *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1998, 65(6), 459-470 (Japan). Nippon Ika Daigaku Igakkaï. DNA bend sites in the promoter region of the human estrogen receptor gene were detected by the circular permutation assay. Among a total of 5 sites (ERB-4 to -1, and ERB+1) mapped in the 3-kb region, 5 matched with the positions of the predicted periodicity while the other 2 did not. Most of the sites were accompanied by the short poly (dA)-poly (dT) tracts including the potential bend core sequence A<sub>2</sub>M<sub>4</sub>A<sub>2</sub>M<sub>4</sub>A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>. Fine mapping of the ERB-2 site indicated that this A/A/A and the immediate flanking sequences contained motifs for the estrogen response element. This region had a higher affinity for the nuclear scaffold and was included in the core region of the nucleosome structure. However, binding of the nuclear factor(s) to the motifs and disruption of the nucleosome structure occurred without ATP. These results suggest that a class of periodic bent DNA could act as a site of multiple interactions among the nuclear scaffold, core histones and nuclear factors.

**130:120337q The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypophorine, the tryptophan betain**

factor of *Frankia*. Nepeyre, Frederic (Recherches Champenoux, J. Verlag. A full-EgHypar, was isolated from *Pinus* clone revealed exhibited a high thione-S-triazine was confined to the rhizosphere development up-regulated in rhus cell-free extract or hypophorine by *P. tinctorius* decrease in root of EgHypar expression this symbiosis-taking place is knowledge, the sion of the horrhizal mycobion

**130:120338r expression of gene.** Turri, A (Division Clin University Zuer. 1441-1447 (En hydropterin syn pathway from C cofactor of NO being responsible rotransmitter b mutations in t phenotypes ran alanine levels c model to study basis of the dise and recombinan on chromosome of 144 codons. 1 Da and shows 8 resp. The mous homogeneity. T ent K<sub>m</sub> of ~10 μl enzyme in liver rat PTPS.

**130:120339s quadrivalents of Botany, Univ soma 1998, 1071 and segregation translocation st: Pachytene trans of immunofluore karyotypes of m phoresis. The tr of the chromoso points, and pro shapes. This all of quadrivalents predominated ov was more frequ centromeres. If tromere, the occ tern of segregati resembled the b eukaryotes. The condensation doe and chromosome higher eukaryote**

**130:120340k duplication of relate with the path, Julia F.; Oral Biology, Un 35294 USA). Vir Bovine viral diar development of a tion of MD requi (cp) and non-cyt cp viruses are ge duplications or r gene is the mos virus. Here the z tion (termed cSN tion of NS3 in a c is identical to th. that of the huma**



4

5

A rabbit flanking of the cat sequenced. man and a hepatic proximal een -3.6 is highly tains an its effect flanking at of the s. region

129: 91241a Analysis of eight cDNAs and six genes for intermediate filament (IF) proteins in the cephalochordate Branchiostoma reveals differences in the IF multigene families of lower chordates and the vertebrates: Riemer, Dieter; Karabinos, Anton; Weber, Klaus (Dep. of Biochemistry, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, D-37077 Goettingen, Germany). *Gene* 1998, 211(2), 361-373 (Eng). Elsevier Science B.V.. We report the sequences of seven new cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins of the cephalochordate Branchiostoma. The eight sequences currently known describe four subfamilies (A, B, C and D). All eight IF proteins show the short-length version of the coil 1b subdomain found in vertebrates and lack the addnl. 42 residues present in all nuclear lamins and the protosomal IF proteins. Although the lancelet is considered to be the closest relative to the vertebrates, it is difficult to relate its IF subfamilies unambiguously to a particular type I-IV subfamily of vertebrates. C1 and C2 have tail domains with two 64 residue repeats of coiled coil-forming ability, a structural feature unknown for IF proteins from vertebrates or protostomia. The epidermal protein D1 shows only a slightly better identity score with vertebrate type II keratins than with type III proteins, but the D1 gene organization is that of type III proteins. The same holds for A1, A2, B1, B2 and C2 genes, although the latter has an addnl. and uniquely positioned intron. Antibodies (Ab) raised against recombinant C2 and D1 proteins reveal these proteins in epidermis, some internal epithelia and parts of the spinal cord. The results on exonic sequences, gene organization and expression suggest that Branchiostoma IF proteins may retain a largely archetypal condition, whereas the vertebrates have established the well-known type I-IV IF system.

129: 91242b A dynein light chain of sea urchin sperm flagella is a homolog of mouse Tctex1, which is encoded by a gene of the t complex sterility locus. Kagami, Osamu; Gotoh, Masuo; Makino, Yumiko; Mohri, Hideo; Kamiya, Ritsui; Ogawa, Kazuo (Laboratory of Cell Communication, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan 444). *Gene* 1998, 211(2), 383-386 (Eng). Elsevier Science B.V.. The outer-arm dynein of sea urchin sperm flagella contains size light chains with mol. masses of 23.2, 20.8, 12.3, 11.5, 10.4 and 9.3 kDa. The authors have cloned a cDNA for the 12.3 kDa polypeptide (light chain 3) and found that this protein is highly homologous to mouse Tctex1, a protein encoded by a member of the multigene family in the t complex region that is involved in male sterility and the development of the germ cells. Tctex1 has recently been shown to be homologous to a light chain of cytoplasmic dynein. Therefore, the cytoplasmic dynein light chain has been implicated in the mechanism for the transmission ratio distortion (meiotic drive) that is characteristic of t haplotypes in mice. This present finding, however, indicates that axonemal light chain 3 must be considered equally important.

129: 91243c Mapping a novel cellular-senescence gene to human chromosome 2q37 by irradiation microcell-mediated chromosome transfer. Uejima, Hiroshi; Shinohara, Tokuyuki; Nakayama, Yuji; Kugoh, Hiroyuki; Oshimura, Mitsuo (Department of Molecular and Cell Genetics, School of Life Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan 683-8503). *Mol. Carcinog.* 1998, 22(1), 34-45 (Eng). Wiley-Liss, Inc.. To identify the subchromosomal region that carries the cellular-senescence-restoring program of the human cervical carcinoma cell line SiHa, we constructed by irradiation microcell-mediated chromosome transfer a library of mouse A9 cells containing various fragments of human chromosome 2 tagged with pSV2neo in 2p11-p12. Eighty-seven clones were isolated and screened for the presence of human sequences by inter-Alu and inter-L1 polymerase chain reaction (PCR); and six clones exhibiting PCR-laddering patterns that differed from those of the A9 cells containing an intact chromosome 2 were examined further. Chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH) using human-specific repetitive sequences revealed that four of these clones contained single subchromosomal transferable fragments (STFs). Southern blot hybridization of 14 cosmid markers revealed that the STFs in A9 cells were derived from human chromosome 2. These STFs were transferred into SiHa cells by microcell fusion, and one of the STFs restored the cellular-senescence program. The concordance of the cellular-senescence-restoring program with the presence or absence of specific DNA fragments of chromosome 2 indicated that the putative cellular-senescence gene was located in 2q32-qter. For more detailed mapping, we constructed mouse A9 cells containing STFs derived from human chromosome 2 tagged with pSTneo at different regions in 2q31-qter. PCR-laddering and FISH analyses were used to identify six clones that contained different STFs. These STFs were transferred into SiHa cells, and one of the three clones that restored cellular senescence contained a small fragment of human chromosome 2. This STF was shown by PCR analysis using 14 human chromosome 2-specific primer pairs to be smaller than 12.2 cM and was mapped to the 2q37 region by FISH analysis with inter-Alu PCR.  $\beta$ -Galactosidase activity, which is a biomarker of senescent cells, and telomerase activity similar to that found in parental SiHa cells were detected in SiHa microcell hybrids, suggesting that the putative cellular-senescence gene was not involved in a telomerase pathway but rather in an alternate pathway of cellular senescence.

129: 91244d Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Frothingham, Richard; Meeker-O'Connell, Winifred A. (Veterans Affairs Medical Center, Durham, NC 27705 USA). *Microbiology (Reading, U.K.)* 1998, 144(5), 1189-1196 (Eng). Society for General Microbiology. Genetic loci containing variable numbers of tandem repeats (VNTR loci) form the basis for human gene mapping and identification, forensic analysis, and

paternity testing. The variability of bacterial tandem repeats has not been systematically studied. Eleven tandem repeat loci in the *M. tuberculosis* genome were analyzed. Five major polymorphic tandem repeat (MPTR) loci contained 15-bp repeats with substantial sequence variation in adjacent copies. Six exact tandem repeat (ETR) loci contained large DNA repeats with identical sequences in adjacent repeats. These 11 loci were amplified in 48 strains to determine the number of tandem repeats at each locus. The strains analyzed included 25 wild-type strains of *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* and 23 sub-strains of the attenuated *M. bovis* BCG vaccine. One of the five MPTR loci and all six ETR loci had length polymorphisms corresponding to insertions or deletions of tandem repeats. Most ETR loci were located in intergenic regions where copy number may influence expression of downstream genes. Each ETR locus had multiple alleles in the panel. Combined analysis identified 22 distinct allele profiles in 25 wild-type strains of the *M. tuberculosis* complex and five allele profiles in 23 *M. bovis* BCG substrains. Allele profiles were reproducible and stable, as demonstrated by analyses of multiple isolates of particular reference strains obtained from different laboratories. VNTR typing may be generally useful for strain differentiation and evolutionary studies in bacteria.

129: 91245e Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. Lan, Ruiting; Reeves, Peter R. (Department of Microbiology, University of Sydney, NSW 2006 Australia). *Microbiology (Reading, U.K.)* 1998, 144(5), 1213-1221 (Eng). Society for General Microbiology. Individual rRNA operons and their flanking regions have been analyzed in a study of the molecular basis of ribotype variation in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. The genome of an early isolate of the seventh pandemic clone had nine rRNA operons of which two were in tandem with other rRNA operons. The site for BglII, the most discriminatory enzyme used for ribotyping, was found to be present in the 16S sequence of three of the operons of the earliest isolate. This site was observed to be gained or lost in specific operons in many later isolates, presumably by recombination, and this gave most of the ribotype variation. Additional rRNA recombination events were uncovered by analysis of the 16S-23S intergenic spacers associated with each operon. Spacers of 431, 509, 607 and 711 bp were found. A total of at least eight rRNA recombination events were detected. Three rRNA loci were primarily involved in this recombination, with four new forms generated from that in the early strains for operon B and two new forms each for operons C and G. In addition, there was variation due to deletion of tandem operons. The frequency of recombination between rRNA operons was very high as there were nine new ribotypes found among 47 isolates sampled over the 33 years of study. This means that any variation could undergo precise reversal by the same recombination event within the time frame covered by the study. Recombination between rRNA operons may be a factor in ribotype variation in all systems. The recombination observed is thought to be that which results in concerted evolution and the data give an indication of the rate involved.

129: 91246f Cloning and chromosomal mapping of the murine norepinephrine transporter. Fritz, Jeffery D.; Jayanthi, Lankupalle D.; Thoreson, Molly A.; Blakely, Randy D. (Department of Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN USA). *J. Neurochem.* 1998, 70(6), 2241-2251 (Eng). Lippincott-Raven Publishers. The norepinephrine (NE) transporter (NET), a target of many clinically prescribed antidepressants, regulates noradrenergic neurotransmission by efficiently clearing NE from synaptic spaces after release. To advance understanding of NET gene structure, regulation, and potential associations with complex behavioral trait loci, the authors amplified a mouse norepinephrine transporter (mNET) cDNA from placenta total RNA and utilized mNET probes to isolate and characterize the mNET gene. Inferred translation of the major open reading frame of the mNET cDNA predicts a 617-amino acid protein with 12 putative membrane-spanning regions and 94% identity to human NET. The coding exons of the mNET cDNA were found to be spread across > 36 kb of 129/Sv genomic DNA, with exon-intron boundaries bearing consensus GT/AG splice sites. Sequence upstream (202 bp) of the inferred translation initiation site matched the sequence of 5' rapid amplification of cDNA ends products from brain mRNA with no evidence for intervening introns and is preceded by a TATA box and canonical transcriptional regulatory elements that may play a role in mNET expression in vivo. Probes derived from mNET cDNA identified species-specific MspI restriction fragment length variations within the mNET gene that were utilized to position the gene (Slc6a5) to murine chromosome 8, one recombinant distal to D8Mit15. This site is within a recently defined quantitative trait locus for ethanol sensitivity in LSXSS recombinant inbred mice, Lore4. The status of Slc6a5 as a candidate gene for alcohol sensitivity is discussed with respect to studies noting ethanol-induced alterations in brain NE receptors, NE receptor-linked adenylyl cyclase, and NE transporter.

129: 91247g Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with *Bacillus subtilis* Pho core binding site. Liu, Wei; Hulett, F. Marion (Laboratory for Molecular Biology, Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60607 USA). *Microbiology (Reading, U.K.)* 1998, 144(5), 1443-1450 (Eng). Society for General Microbiology. The phosphate-deficiency response in *Bacillus subtilis* is regulated by PhoP and PhoR, a pair of two-component regulatory proteins. PhoR is a histidine kinase and PhoP is a response regulator. Genetic evidence indicates that the Pho-regulon genes, which are induced or repressed under phosphate starvation conditions, are regulated by PhoP and PhoR at the transcriptional level. It has previously been





Page 261

genes between the clones. Finally, fiber-FISH was found to be the method of choice for the construction of an accurate high-resolution map of the centromere established over the restricted region. Thus, FISH techniques in combination with genetic mapping data enabled the refinement of the centromeric 4-cM region to a high-resolution map of only 400 kb in length. Here the FISH strategy replaced the need for many laborious traditional physical mapping methods, e.g., pulsed-field gel electrophoresis.

125:266827t. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. Chiang, Pei-Wen; Song, Woo-Joo; Wu, Kai-Yuan; Korenberg, Julie; Fogel, Eric J.; Van Keuren, Margaret L.; Lashkari, Deval; Kurnit, David M.; (Howard Hughes Med. Inst.; Univ. Michigan Med. Sch., Ann Arbor, MI 48109-0650 USA). *Genome Res.* 1996, 6(10), 1013-1026 (Eng). We present a fluorescent-PCR-based technique to assay genomic sequence copy no. and transcriptional abundance. This technique relies on the ability to follow fluorescent PCR progressively in real time during the exponential phase of the reaction so that quant. PCR is accomplished. We demonstrated the ability of this technique to quantitate both known deletions and amplifications of loci that have been measured previously by other methods, and to measure transcriptional abundance. Using an efficient variant of the fluorescent-PCR technol., we can monitor transcription semiquant. The ability to detect all amplifications variations in transcript abundance enables this technique to fashion a time and tissue anal. of transcription.

125:266828u. A Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov chain Monte Carlo. Satagopan, Jaya M.; Yan, Brian S.; Newton, Michael A.; Osborn, Thomas C. (Department Epidemiology and Biostatistics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021-6094 USA). *Genetics* 1996, 144(2), 805-816 (Eng). Markov chain Monte Carlo (MCMC) techniques are applied to simultaneously identify multiple quantitative trait loci (QTL) and the magnitude of their effects. Using a Bayesian approach a multi-locus model is fit to quant. trait and mol. marker data, instead of fitting one locus at a time. The phenotypic trait is modeled as a linear function of the additive and dominance effects of the unknown QTL genotypes. Inference summaries for the locations of the QTL and their effects are derived from the corresponding marginal posterior densities obtained by integrating the likelihood, rather than by optimizing the joint likelihood surface. This is done using MCMC by treating the unknown QTL genotypes, and any missing marker genotypes, as augmented data and then by including these unknowns in the Markov chain-cycle along with the unknown parameters. Parameter estimates are obtained as means of the corresponding marginal posterior densities. High posterior density regions of the marginal densities are obtained as confidence regions. We examine flowering time data from double haploid progeny of *Brassica napus* to illustrate the proposed method.

125:266829v. Direct determination of ABO and cis AB blood group genotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles (PASA) method. Hosoi, Eiji (Sch. Med. Sci., Univ. Tokushima, Tokushima, Japan 770). *Rinsho Byori* 1996, 44(8), 783-789 (Japan). The genotypes of genomic DNAs of 20 normal subjects with ABO blood group and 12 subjects with cis AB blood group were directly detd. using PASA method. This method is based on the fact that PCR amplification occurs only when the 3' terminal of the primer is matched to the nucleotide of No. 261, 526, 796, or 803 of ABO allelic DNAs. And 3 of 5 regions of allelic DNAs were co-amplified in a single PCR (multiplex-PCR) in this study. ABO and cis AB blood group genotypes were directly detd. based on the mol. size of allele specific amplification products that contain 261, 526, 796, and 803 nucleotide (the sites of amino acid substitutions). The method is rapid, simple, and useful for detecting the genotype of ABO and cis AB blood groups.

125:266830p. Identification of lactic acid bacteria by 16S rRNA sequences. Igarashi, Akira; Mori, Katumi (Gunma Prefect. Ind. Technol. Res. Lab., Maebashi, Japan 371). *Gunma Ken Kogyo Shikento Kenkyu Hokoku* 1995 (Pub. 1996), 116-122 (Japan). 16S rRNA sequence of lactic acid bacteria were detd. using PCR method and dideoxy method, and compared with the data base for identification of lactic acid bacteria. As a result, the isolates from the dough for baked bean-jam bun were identified as *Lactobacillus paracasei*. The isolates from the dough for Mongolian steamed bean-jam bun were identified as *Leuconostoc mesenteroides*.

125:266831q. Detection of microsatellite instability in cancers by arbitrarily primed-PCR fingerprinting using a fluorescently labeled primer (FAP-PCR). Yasuda, Jun; Kashiwabara, Hidefumi; Kawakami, Keita; Uematsu, Kazutosugu; Sugano, Kokichi; Peruchio, Manuel; Sekiya, Takao. (Oncogene Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan 104). *Biol. Chem.* 1996, 377(9), 563-570 (Eng). This enhanced instability of the microsatellite mutator phenotype (MMP) was discovered by arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) fingerprinting of DNA from colon cancers. An arbitrary primer was found that can amplify multiple DNA fragments with fluorescence and an automated DNA sequencing anal. of AP-PCR products (FAP-PCR) detected alterations in fingerprint bands in all DNA samples previously detd. to belong to the MMP. Fluorescent AP-PCR fingerprinting by this single arbitrary primer provides a convenient and efficient method for detecting tumor specific fingerprint alterations that are usually undetectable by conventional fingerprinting.

125:266832r. Usage of consensus polymerase chain reaction (PCR) assays from variable ribosomal regions for the detection

of bacterial infections of the human central nervous system: Rolfs, A.; Albrecht, Bettina (Neurol. Klin., Univ. Rostock, D-18055 Rostock, Germany). *Laboratoriumsmedizin* 1996, 20(9), 500-503 (Eng). A PCR procedure is described for the identification of a no. of pathogens being responsible for bacterial meningitis or meningoencephalitis using the 23S-5S intergenic spacer region in a universal consensus PCR. The 23S-5S intergenic sequence of nine bacteria that are often the cause of meningitis or meningoencephalitis are demonstrated. The resulting sequence consists of three domains: the conserved 3' region of 23S rDNA, the complete 23S-5S spacer region, and the conserved 5' region of the 5S rDNA. In all cases an ambiguous sequence could be obtained. The length of the sequences varied from 269 bp to 322 bp. As expected, sequences in the 23S and 5S regions were rather conserved among bacteria which are closely related in a phylogenetic manner. The intergenic ribosomal sequences described allow the identification of the most frequent cause of meningitis and can form the basis of a more rapid and sensitive means of detecting bacteria in CSF.

125:266833s. Regulation of acid phosphatases in an *Aspergillus niger* pacC disruption strain. van den Hombergh, Johannes P. T. W.; McCabe, Andrew P.; van de Vondervoort, Peter J. I.; Visser, Jaap (Section Molecular Genetics of Industrial Microorganisms, Wageningen Agricultural Univ., NL-6703 Wageningen, Netherlands). *Mol. Gen. Genet.* 1996, 251(5), 542-550 (Eng). An *Aspergillus niger* strain has been constructed in which the pH-dependent regulatory gene, pacC, was disrupted. The pacC gene of *A. niger*, like that of *A. nidulans*, is involved in the regulation of acid phosphatase expression. Disruptants were identified by a redn. in acid phosphatase staining of colonies. Southern anal. demonstrated integration of the disruption plasmid at the pacC locus and Northern anal. showed that the disruption strain produced a truncated pacC mRNA of 2.2 kb (as compared to 2.8 kb in the wild type). The strain carrying the pacC disruption was used to assign the pacC gene to linkage group IV; this was confirmed by CHEF electrophoresis and Southern anal. This strain further allowed us to det. which extracellular enzyme and transport systems are under the control of pacC in *A. niger*. Expression of the *A. niger* pacC wild-type gene and the truncated pacC gene showed that, in contrast to the auto-regulated wild-type expression, which was elevated only at alk. pH, the truncated pacC gene was deregulated; as high-level expression occurred regardless of the pH of the culture medium. Anal. of the phosphatase spectrum by isoelec. focussing and enzyme activity staining both in the wild-type and the pacC disruptant showed that at least three acid phosphatases are regulated by the pacC. For the single alk. phosphatase no pH regulation was obsd.

125:266834t. Complexes of non-cationic liposomes and histone H1 mediate efficient transfection of DNA without encapsulation. Hagström, James E.; Sebestyen, Magdolna G.; Budker, Vladimir; Ludtke, James J.; Fritz, Jeffery D.; Wolff, Jon A. (Departments of Pediatrics and Medical Genetics, Waisman Center, University of Wisconsin-Madison, Rm. 361, 1500 Highland Ave., Madison, WI 53705 USA). *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1284(1), 47-55 (Eng). Transfection competent complexes were assembled using a three component system. The constituents of the basic system were plasmid DNA, cationic DNA binding protein (NLS-H1) and anionic liposomes (dioleoylphosphatidylcholine, DOPE) or phosphatidylserine (PS). In contrast to cationic liposome/DNA binary complexes, all of the DNA in these ternary complexes was sensitive to DNase I degradn. and ethidium bromide intercalation. Transmission electron microscopy revealed that these ternary complexes formed unique structures in which the DNA was located either on the outside of individual liposomes or bridging two or more liposomes. This provides evidence that plasmid DNA encapsulation is not essential for transfection competency.

125:266835u. Recombinant adeno-associated virus-mediated, high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors. Bertran, Joan; Miller, Jeffery L.; Yang, Yanping; Fenimore, Justman; Angela, Rueda, Felix; Vanin, Elio F.; Nienhuis, Arthur W. (Division Experimental Hematology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105 USA). *J. Virol.* 1996, 70(10), 6759-6766 (Eng). Adeno-associated virus has a broad host range, is nonpathogenic, and integrates into a preferred location on chromosome 19; features that have fostered development of recombinant adeno-associated viruses (rAAV) as gene transfer vectors for therapeutic applications. The authors have used an rAAV to transfer and express the murine cationic amino acid transporter which functions as the ecotropic retroviral receptor, thereby rendering human cells conditionally susceptible to infection by an ecotropic retroviral vector. The proportion of human HeLa cells expressing the receptor at 60 h varied as a function of the multiplicity of infection (MOI) with the rAAV. Cells expressing the ecotropic receptor were efficiently transduced with an ecotropic retroviral vector encoding a nucleus-localized form of  $\beta$ -galactosidase. Cells coexpressing the ecotropic receptor and nucleus-localized  $\beta$ -galactosidase were isolated by fluorescence-activated cell sorting, and cell lines were recovered by cloning at limiting diln. After growth in culture, all clones contained the retroviral vector genome, but fewer than 10% (3 of 47) contained the rAAV genome and continued to express the ecotropic receptor. The ecotropic receptor coding sequences in the rAAV genome were under the control of a tetracycline-modulated promoter. In the presence of tetracycline, receptor expression was low and the proportion of cells transduced by the ecotropic retroviral vector was decreased. Modulation of receptor expression was achieved with both an episomal and an integrated





of all markers from non-templated addn. of nucleotide. On the other hand, placing the sequence GTTCTT on the 5' end of reverse primers resulted in nearly 100% adenylation of the 3' end of the forward strand. This modification or related ones (called "PIG-tailing") should facilitate accurate genotyping and efficient T/A cloning.

125:50189p The accessibility of thiophosphorylated groups in DNA fragments to the enzymic activity of ligases and restriction endonuclease BbsI. Schenk, Joerg; Heymann, Stephan; Michael, Burkhard (Inst. Medical Immunology, Humboldt Univ., D-13125 Berlin, Germany). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995, 36(5), 1037-1043 (Eng). The aim of this paper was to test the possibility of ligating and hydrolyzing DNA sequences contg. thiomodified ends and bonds. T4 DNA ligase was shown to ligate DNA fragments regardless of whether it contains phosphorylated or thiophosphorylated 5'-ends. But the cleavage of an internally thiomodified phosphodiester bond was found to be totally inhibited when using the nonpalindromic restriction enzyme BbsI. The special properties of this restriction endonuclease should allow the development of an oriented cloning strategy when combined with T4 ligase and a thiophosphorylation of DNA fragments.

125:50190g Quantitative analysis of  $\alpha 1$  (I) procollagen transcripts in vivo by competitive polymerase chain reaction. Thur, Jochen; Nischt, Roswitha; Krieg, Thomas; Hunzelmann, Nicolas (Inst. for Biochemistry, Univ. of Cologne, Germany). *Matrix Biol.* 1996, 15(1), 49-52 (Eng). Due to the limited amt. of RNA obtainable from punch biopsies, few data exist on the human  $\alpha 1$  (I) procollagen mRNA steady state level in vivo. Therefore, we established a competitive PCR method to quantitate this mRNA in human biopsies. In our approach, the target and the std. share the same sequence except for a 69 bp deletion, thus competing for the same primer pair and subsequently amplifying at the same rate. Titrn. of a competitor DNA diln. series against an unknown cDNA sample then allows quantitation of the sepd. and non-radioactively detected PCR products after densitometrical anal. Almost identical results were obtained by quantitation of the same total RNA by competitive PCR as well as Northern blot anal.

125:50191h Analysis of ligase chain reaction products via matrix-assisted-laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry. Jurinke, Christian; van den Boom, Dirk; Jacob, Anette; Tang, Kai; Woerl, Ralf; Koester, Hubert (Fac. Chemistry, Univ. Hamburg, D-20146 Hamburg, Germany). *Anal. Biochem.* 1996, 237(2), 174-181 (Eng). A rapid and accurate detection of ligation products generated in ligase chain reactions (LCR) by using matrix-assisted spectrometry (MALDI-TOF-MS) is reported. LCR with Pfu DNA ligase was performed with a wild-type template and a template carrying a single point mutation within the *Escherichia coli* lacI gene as a model system. Starting from about 1 fmol of template DNA the ligation product generated in the pos. reactions was analyzed with HPLC and MALDI-TOF-MS, whereby the need of proper sample purifn. prior to mass spectrometric anal. was demonstrated. A purifn. procedure with a high potential for automation using streptavidin-coated magnetic particles and ultrafiltration was introduced. Plasmid DNA and short single-stranded oligonucleotides have been used as template. A point mutation could be discriminated from the wild-type template due to the absence or presence of ligation product. This approach allows the rapid-specific detection of template DNA in femtomole amts. and moreover can distinguish between sequence variations in DNA mols. down to point mutations without the need for labeling, gel electrophoresis, membrane transfer, and hybridization procedures.

125:50192j A new approach using multiplex long accurate PCR and yeast artificial chromosomes for bacterial chromosome mapping and sequencing. Sorokin, Alexei; Lapidus, Alla; Capuano, Veronique; Galleron, Nathalie; Pujic, Petar; Ehrlich, S. Dusko (Lab. Genetique Microbienne, Inst. Natl. Rech. Agronomique, 78352 Jouy en Josas, Fr.). *Genome Res.* 1996, 6(5), 448-453 (Eng). An efficient approach for structural studies on bacterial chromosomes is presented. It is based on high-resoln. PCR map construction by using a multiplex long accurate PCR (MLA PCR) protocol and a YAC clone carrying the region to be mapped as indicator. The high-resoln. PCR map of the *Bacillus subtilis* mB-dnaB region is presented as an example. Data are also presented on the use of DNA generated by LA PCR for sequencing; they are relevant to LA PCR induced mutations and justify the application of such mapping for sequencing long stretches of bacterial chromosomes.

125:50193k Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. Jin, L.; Richards, A.; Brown, D. W. G. (Enteric Respiratory Virus Lab., Cent. Public Health Lab., London, UK NW9 5HT). *Mol. Cell. Probes* 1996, 10(3), 191-200 (Eng). A polymerase chain reaction (PCR) method was developed for detecting measles virus (MV) RNA in a variety of clinical samples using primer pairs in the nucleocapsid (N) and matrix (M) genes in one reaction (dual target-PCR). The dual target-PCR detected MV RNA in tissue culture fluid contg. 1 TCID<sub>50</sub> of the MV Loss strain, and was as sensitive as a single target-PCR. Specificity was confirmed by the failure of the dual target-PCR to amplify products from the infected tissue culture contg. related paramyxoviruses. Thirty-two of 35 (91.4%) samples collected from 23 patients with confirmed measles infection by the detection of measles specific IgM were found to be pos. for MV RNA by PCR. Direct sequencing of the PCR amplicons revealed three different genotypes among the MV strains that were detected in 12 patients. The dual target-PCR method is suitable for the diagnosis of measles infection and, based on the sequencing of the PCR product DNA, for investigating the mol. epidemiol. of MV strains.

125:50194m Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. Khiri, Hacene; Reynier, Pascal; Peyrol, Nicole; Lerique, Brice; Torresani, Janine; Planells, Richard (Fac. Med., Marseille, Fr.). *Mol. Cell. Probes* 1996, 10(3), 201-211 (Eng). The use of RT-PCR to quantify mRNA is often compromised by the variability of reverse-transcription and amplification reactions as well as by the difficulty of assessing the amt. and/or the integrity of input RNA. Use of a competitor RNA or the coamplification of an endogenous std. are widespread methods of monitoring these steps. Taking advantage of both sequence conservation between homologous genes in related animal species and interspecific polymorphism, a protocol that may be regarded as a compromise between these two methods is described here. Total RNA samples, extd. from even minute amts. of tissue belonging to a first animal species, which supplemented with a const. amt. of total RNA prep. from a second animal species, which thus acts as a multistandard source. The mixt. was reverse-transcribed using hexa-random primers. Sep. PCRs were then undertaken so that, for each mRNA of interest, products from both origins could be distinguished. Since the ratio between amplified mRNAs is const. in the std. prep., an accurate normalization in the assay samples of most variations inherent to PCR is obtained. This protocol allows quantification of several mRNAs species, whose amts. may be very different, in a single cDNA prep.

125:50195n Tagging ribozyme reaction sites to follow trans-splicing in mammalian cells. Jones, Joshua T.; Lee, Seong-Wook; Sullenger, Bruce A. (Departments of Experimental Surgery and Genetics, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710 USA). *Nat. Med.* (N. Y.) 1996, 2(6), 643-648 (Eng). In mammalian cells, genetic instructions are usually revised by RNA splicing before they are translated to proteins. Here the authors demonstrate that a trans-splicing group I ribozyme can be employed to intentionally modify the sequence of targeted transcripts in tissue culture cells. By analyzing the ribozyme reaction products, the authors demonstrate that targeted trans-splicing can proceed in murine fibroblasts with high fidelity, providing direct evidence that ribozymes function as anticipated in a therapeutically relevant setting. Trans-splicing is not very specific however, and the ribozyme reacted with and tagged a variety of cellular transcripts with its 3' exon sequence. RNA tagging provides a unique approach to study RNA catalysis in mammalian cells. Such anal. should facilitate the logical development of safe, therapeutic ribozymes that can repair mutant RNAs assoc. with a variety of inherited diseases.

125:50196p A Capillary Array Gel Electrophoresis System Using Multiple Laser Focusing for DNA Sequencing. Anazawa, Takashi; Takahashi, Satoshi; Kambara, Hideki (Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan 185). *Anal. Chem.* 1996, 68(15), 2699-2704 (Eng). A very simple and highly sensitive capillary array gel electrophoresis system is constructed to analyze DNA fragments. On-column detection of DNA migration in a large no. of gel-filled capillaries is carried out using side-entry laser irradiation and with a CCD camera, although it has been considered impossible because the irradiation laser is scattered strongly at the surfaces of the first few capillaries. By optimizing optical conditions, the laser beam can be focused repeatedly to irradiate all the capillaries held on a plate by working each capillary as a cylindrical convex lens. DNA sequencing samples migrating in 24 capillaries can simultaneously be analyzed with the system.

125:50197q Identification of lactic acid bacteria by ribotyping. Breidt, Fred; Fleming, Henry P. (Food Fermentation Laboratory, Agricultural Research Service, Raleigh, NC 27695-7624 USA). *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 1996, 4(3), 219-233 (Eng). Current methods that can be used for the identification of lactic acid bacteria (LAB) include: biochem. tests, pulsed field gel electrophoresis, and fatty acid anal. These methods can be costly, time-consuming, and tech. difficult. We are investigating the microbial ecol. of vegetable ferms. and are interested in the rapid identification of LAB isolates. We adapted a PCR-based ribotyping method for use with LAB. The PCR product(s) produced contains the sequences from the intergenic spacer regions between the rRNA genes. These products can be resolved by std. agarose or acrylamide gel electrophoresis. With this method, we identified PCR product electrophoresis banding patterns for the primary species of LAB found in vegetable ferms., including those from the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Pediococcus*.

125:50198r Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. Chen, Chun-Lin; Liu, Qing; Relling, Mary V. (Departments of Pharmaceutical Sciences and Biostatistics, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38101 USA). *Pharmacogenetics* 1996, 6(2), 187-191 (Eng). Human glutathione S-transferase (GST) M1 and T1 enzymes exhibit genetic polymorphism, with a percentage of normal individuals exhibiting a homozygous deletion of the relevant genes. The authors established a differential polymerase chain reaction (PCR) technique to simultaneously characterize inactivating mutations responsible for the null alleles of GSTM1 and GSTT1. Primers for GSTM1, GSTT1, and for  $\beta$ -globin (as a pos. control) were used to simultaneously amplify all three gene products from leukocyte DNA from 416 normal healthy human volunteers. Identical GSTM1 and GSTT1 genotypes were obtained using nine samples processed either sep. or simultaneously for GSTM1 and GSTT1. The frequency of the null genotype for GSTM1 was higher in whites (114/213 or 53.5% vs. 56/203 or 27.6%) and for GSTT1 was higher in blacks (49/203 or 24.1% vs. 32/213 or 15.0%). The obsd. frequency of the 'double null' genotype for both GSTM1 and GSTT1 was not significantly different from that predicted if both polymorphisms were independent and did not differ by



124:136853s Detection of point mutations in chloroplast genes of *Antirrhinum majus* L. I. Identification of a point mutation in the *psaB* gene of a photosystem I plastome mutant. Schaffner, Claudia; Laasch, Henrik; Hagemann, Rudolf (Inst. Genet., Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg, D-06108 Halle/Saale, Germany). *Mol. Gen. Genet.* 1995, 249(5), 533-44 (Eng). A point mutation in the plastome-encoded *psaB* gene of the mutant *en:alba-1* of *Antirrhinum majus* L. was identified by an anal. of chloroplast DNA with a modified PCR-SSCP technique. Application of this technique is indicated when a gene or a group of genes is known in which the point mutation is located. Anal. of primary photosynthetic reactions in the yellowish white plastome mutant indicated a dysfunction of photosystem (PS) I. The peak wavelength of PS I-dependent chlorophyll (Chl) fluorescence emission at 77 K was shifted by 4 nm to 730 nm, as compared to fluorescence from wild-type. There were no redox transients of the reaction center Chl  $P_{700}$  upon illumination of leaves with continuous far-red light or with rate-satg. flashes of white light. The PS I reaction center proteins *PsaA* and *PsaB* are not detectable by SDS-PAGE in mutant plastids. Hence, plastome encoded PS I genes were regarded as putative sites of mutation. To identify plastome mutations we developed a modified SSCP (single-strand conformation polymorphism) procedure using a large PCR fragment which can be cleaved with various restriction enzymes. When DNA from wild-type and *en:alba-1* was submitted to SSCP anal., a single stranded HinfI fragment of a PCR product of the *psaB* gene showed differences in electrophoretic mobility. Sequence anal. revealed that the obsd. SSCP was caused by a single base substitution at codon 136 (TAT → TAG) of the *psaB* gene. The point mutation produces a new stop codon that leads to a truncated *PsaB* protein. The results presented indicate that the mutation prevents the assembly of a functional PS I complex. The applicability to other plastome mutants of the new method for detection of point mutations is discussed.

124:136854t Error detection for genetic data, using likelihood methods. Ehm, Margaret Gelder; Kimmel, Marek; Cottingham, Robert W., Jr. (Department of Statistics, Rice University, USA). *Am. J. Hum. Genet.* 1996, 58(1), 225-34 (Eng). As genetic maps become denser, the effect of lab. typing errors becomes more serious. The authors review a general method for detecting errors in pedigree genotyping data that is a variant of the likelihood-ratio test statistic. It pinpoints individuals and loci with relatively unlikely genotypes. Power and significance studies using Monte Carlo methods are shown by using simulated data with pedigree structures similar to the CEPH pedigrees and a larger exptl. pedigree used in the study of idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). The studies show the index detects errors for small values of  $\theta$  with high power and an acceptable false pos. rate. The method was also used to check for errors in DCM lab. pedigree data and to est. the error rate in CEPH chromosome 6 data. The errors flagged by the method in the DCM pedigree were confirmed by the lab. The results are consistent with estd. false-pos. and false-neg. rates obtained using simulation.

124:136855u Analysis of double-stranded polymerase chain reaction products from the *Bacillus cereus* group by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Wunschel, David S.; Fox, Karen F.; Fox, Alvin; Bruce, James E.; Muddiman, David C.; Smith, Richard D. (Dep. Microbiol. Immunol., Univ. South Carolina, Columbia, SC 29209 USA). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10(1), 29-35 (Eng). The anal. of polymerase chain reaction (PCR) products by electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FTICR) has been achieved. Specifically, a 105 base-pair nucleotide region of the ribosomal spacer region was amplified in two members of the *B. cereus* group (i.e. *B. thuringiensis* and *B. cereus*) using PCR. These amplified regions were then analyzed by gel electrophoresis and ESI-FTICR. Based on the predicted sequence of the PCR products for each organism, the mass measurement using ESI-FTICR matched the theor. mass within exptl. error and was consistent with gel electrophoresis results. In contrast, for the typical several hour time-scale of the gel electrophoresis exptl., the mass spectrometric anal. was completed in a matter of minutes. To our knowledge, this constitutes the first report demonstrating the ionization and detection of a double-stranded PCR product by ESI-MS. This preliminary result indicates the potential use of ESI-MS to analyze PCR products on a rapid time-scale, with potential for medical and taxonomic applications.

124:136856v PCR analysis of hepatitis B virus DNA in paraffin-embedded liver tissue from patients with chronic liver disease. Chapel, F.; de Lamballerie, X.; de Micco, C.; Lebreuil, G.; de Micco, P. (Fac. Med. Nord, Hop. Timone, Marseille, Fr.). *Pathol., Res. Pract.* 1995, 191(10), 961-6 (Eng). We described a nested polymerase chain reaction protocol to detect hepatitis B viral DNA in paraffin-embedded liver tissue and tried to det. whether this virus was assoc. with non-B chronic liver disease. Fifty-five samples were obtained from 28 patients with B and 27 patients with non-B chronic liver disease (35 cirrhosis, 4 hepatocellular carcinoma and 16 chronic hepatitis). The two sets of primers amplify a sequence located in a conserved polymerase/surface region of the viral genome. Reaction products were analyzed using a nonisotopic hybridization method. None of the 27 (0%) seroneg. samples and 20 of the 28 (71%) seropos. specimens were pos. for hepatitis B virus DNA. There were 4 false negatives in which  $\beta$ -globin PCR was pos. Although its sensitivity is reduced in formalin-fixed paraffin-embedded tissue, nested PCR allows rapid detection of HBV DNA sequences and can be a useful tool if no frozen tissue is available.

124:136857w Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence

repeat (ISSR) amplification. Kantety, Ramesh V.; Zeng, Xiaoping; Bennetzen, Jeffrey L.; Zehr, Brent E. (Dep. Agronomy, Purdue Univ., West Lafayette, IN 47907 USA). *Mol. Breed.* 1995, 1(4), 365-73 (Eng). Popcorn (*Zea mays* L.) hybrids grown in the United States are derived from narrow-based germplasm, and std. RFLP anal. detects relatively little polymorphism. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification, a novel technique based on PCR amplification of inter-microsatellite sequences to target multiple loci in the genome, was employed to investigate its potential for detection of polymorphism among nineteen popcorn and eight dent corn inbred lines. ISSR yielded an av. of 54 bands/primer/inbred line, with over 98% of the bands repeatable across DNA extns. and sep. PCR runs. Ten primers based on di- and tri-nucleotide tandem repeats revealed 73% and 87% polymorphism among popcorn and dent corn lines, resp., with an overall 95% polymorphism rate. Principal component and cluster analyses resulted in grouping of dent and popcorn lines corresponding to their heterotic breeding pools. ISSR amplification, in addn. to being both simple and cost and time efficient, provides for rapid prodn. of highly polymorphic markers which appear to correspond to known pedigree information. Therefore, the ISSR technique may have great potential for identifying polymorphism in species with narrow-based germplasm, and for use in DNA marker-assisted breeding approaches.

124:136858x Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Dutch Ixodes ricinus ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. Rijpkema, Sjoerd G. T.; Mokenboer, Marc J. C. H.; Schouls, Leo M.; Jongejans, Frans; Schellekens, Joop F. P. (Laboratory Bacteriology and Antimicrobial Agents, National Institute Public Health and Environment, Bilthoven, Neth.). *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33(12), 3091-5 (Eng). We developed a rapid and reliable method for the identification *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in ticks. We used the DNA sequence polymorphism of the spacer region between 5S and 23S rRNA genes, which has been shown to be able to discriminate between eight genomic groups of *B. burgdorferi* sensu lato (D. Postic, M. Assous, P. A. D. Grimont, and G. Baranton, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:743-752, 1994). Spacer DNA was amplified by PCR and was then hybridized to five membrane-bound oligonucleotides. The oligonucleotides were specific for *B. burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and group VS116. A probe which reacted with all genomic groups of *B. burgdorferi* sensu lato was also used. Ninety-six ticks collected in the field were destructed by bead beating, and the supernatant was used directly in a PCR. *B. burgdorferi* sensu lato DNA was detected in 6 of 57 adult ticks (11%) and 9 of 39 nymphs (23%). *B. garinii* was found in three nymphs and one nymph carried group VS116. Double infections with *B. afzelii* and group VS116 were found in two nymphs and one adult. Thus, our method can simultaneously identify three genomic groups of *B. burgdorferi* sensu lato in ticks collected in the field. This technique provides new ways to study the assocn. of genomic groups present in ticks and the risk of Lyme borreliosis.

124:136859y Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. Flemmig, Thomas F.; Rue diger, Stefan; Hofmann, Ulrich; Schmidt, Herbert; Plachke, Barbara; Straetz, Anja; Klaiber, Bernd; Karch, Helge (Department Operative Dentistry and Periodontics, Julius Maximilian University, Wuerzburg, Germany). *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33(12), 3102-5 (Eng). The purpose of this study was to assess the sensitivity and specificity of the PCR in detecting *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. The PCR's detection capability was compared with those of three other methods: culture-enhanced PCR (CE-PCR), colony hybridization (CH), and conventional culture with presumptive biochem. identification. A 285-bp stretch of the leukotoxin gene *lktA* of *A. actinomycetemcomitans* was amplified by PCR with primers TT-15 and TT-16. For CH, the PCR product was labeled with digoxigenin and used as a hybridization probe. Nucleotide sequence anal. of the PCR product of *A. actinomycetemcomitans* 1D4 and 1664 and three clin. isolates revealed complete homol. among the tested strains, with only one base substitution (at position 1344) in comparison with the published sequence. With artificially infected subgingival plaque, the detection limit of PCR for *A. actinomycetemcomitans* was  $10^3$  CFU/mL of plaque suspension. Culturing subgingival plaque on tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin agar prior to PCR (CE-PCR) improved the limit of detection to  $10^2$  CFU/mL. Anal. of subgingival plaque samples from 35 patients with periodontal disease and 10 periodontally healthy subjects revealed that CE-PCR and CH had the highest overall rate of *A. actinomycetemcomitans* detection (both 58%), followed by PCR and culture (both 42%). With CH as the "gold std.," the sensitivities of CE-PCR, PCR, and culture were 88, 65, and 58%, resp.; the specificities were 84, 89, and 79%, resp. The CE-PCR provided acceptable pos. and neg. predictive values ( $\geq 70\%$ ) when the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* varied between 30 and 70%. PCR alone provided comparable predictive values over a narrower range of prevalence rates (30 to 50%), while culture did not afford acceptable predictive values at any prevalence rate. PCR and CE-PCR were found to be superior to culture with presumptive biochem. identification and should be the preferred methods for the detection of *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque.

124:136860s Ligase chain reaction for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital swabs. Ching, Shanfun; Lee, Helen; Hook, Edward W. III; Jacobs, Michael R.; Zenilman, Jonathan (Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064 USA). *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33(12), 3111-14 (Eng). The ligase chain reaction



400 bases by detecting fluorescence signals generated from the bands during the scan. The present scan speed is essentially limited by a slow strip-chart recorder and could be greatly increased by employing a fast data acquisition system.

123: 134252a Advances in genosensor research. Beattie, Kenneth L.; Beattie, Wanda G.; Meng, Lin; Turner, Saralinda L.; Coral-Vazquez, Ramon; Smith, Don D.; McIntyre, Peter M.; Dao, Dat D. (DNA Technology Laboratory, Houston Advanced Res. Center, The Woodlands, TX 77381 USA). *Clin. Chem. (Washington, D. C.)* 1995, 41(5), 700-6 (Eng). Microfabricated devices containing arrays of nucleic acid hybridization sites, known as genosensors, are being developed for a variety of uses in genomic anal. A great deal of the overall genosensor development effort involves optimization of exptl. conditions in the actual use of genosensors. A "low-tech" form of genosensor technol. is described involving arrays of oligonucleotides on glass microscope slides, which can be used to define optimal operating conditions and to develop applications of hybridization arrays in genome mapping and sequencing. In addn., a porous silicon genosensor is described which can be operated in a flowthrough mode, and its advantages over current flat-surface designs are discussed. Porous silicon genosensors containing arrays of DNA fragments offer several unique capabilities in genome anal.

123: 134253b Application of the polymerase chain reaction (PCR) to quantify micro-metastasis in an experimental animal. Matano, Sadaya; Ryoyma, Kazuo; Nakamura, Shinobu; Okada, Gensaku; Nomura, Takahiro (Department of 3rd Intern. Med., School Med., Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ., 13-1 Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa, Japan 920). *Cancer Lett. (Shannon, Irel.)* 1995, 91(1), 93-9 (Eng). In vitro cultured r/mHM-SFME-1 cells were injected into the hind foot pads of Balb/c mice. Metastasis was detected in the lungs of tumor-bearing mice by means of both PCR and histol. methods. Primers for the PCR were set to amplify a 128 bp exon-1 sequence of the human c-Ha-ras gene which had been introduced into the cells. Resulted PCR bands were densitometrically quantified using a bioimage analyzer, and more than  $1 \times 10^4$  tumor cells were detectable in the mouse lung. The no. of tumor cells per lung estd. from the amt. of PCR products was  $1 \times 10^5$ ,  $15 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  and  $40 \times 10^5$  on days 7, 14, 21 and 28 resp. after the tumor injection. No metastases were histol. obsd. on days 7 and 14. Then, the possibility of using this model system for evaluation of a treatment against micro-metastases is discussed.

123: 134254c Analysis of recombination junctions in extrachromosomal circular DNA obtained by in-gel competitive reassociation. Iwasaki, Toshiyasu; Ohki, Rieko; Kiyama, Ryoiti; Oishi, Michio (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113). *FEBS Lett.* 1995, 363(3), 239-45 (Eng). Essentially all eukaryotic cells contain circular extrachromosomal DNA as a result of excision from the chromosomes. To obtain insight into the nature of recombination assocd. with the occurrence of such DNA species and its biol. significance, a library enriched in recombination junctions was constructed by a novel DNA subtraction technique, in-gel competitive reassocn. (IGCR). Furthermore, inverse PCR was introduced to characterize chromosomal DNA fragments containing the recombination junctions. At least 45% of the clones in the library constructed by the IGCR procedure comprised DNA with recombination junctions. Nucleotide sequence anal. of the recombination junctions indicated that 3 of 4 extrachromosomal DNAs thus analyzed were produced through recombination between sequences with a 3-5 bp homol. in the chromosomes. One extrachromosomal DNA was apparently generated through non-homologous recombination, possibly by end-to-end joining. These results have demonstrated the usefulness of IGCR in concg. recombination junctions, which provide the most direct evidence for the mechanism of the recombinational events involved, from highly complex genomes.

123: 134255d Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. Mehling, Annette; Wehmeier, Udo F.; Piepersberg, Wolfgang (Bergische Universitaet GH Wuppertal, AG Chemische Mikrobiologie, D-42097 Wuppertal, Germany). *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 128(2), 119-25 (Eng). Various arbitrary primers as well as pUC18/19 'reverse' sequencing primers were used for random amplified polymorphic DNA assays. Use of a modified reverse primer led to amplification of one major approx. 1100-bp band from the chromosomal DNA of all actinomycetes tested; however, the band was not found when DNAs from other bacteria were used in comparable expts. Hybridization expts. showed that these bands all contained similar genomic regions. Subsequent sequencing of four of these fragments showed they each contained the sequence of the 3' end of the 23S rRNA gene, the intergenic region and the start of the 5S rRNA gene.

123: 134256e Comparison of DGGE and CDGE in detection of single base changes in the hamster hprt and human N-ras genes. Ridanpaa, Maaret; Burvall, Karin; Zhang, Li Hua; Husgafvel-Pursiainen, Kirsti; Onfelt, Agneta (Finnish Institute of Occupational Health, FIN-00250 Helsinki, Finland). *Mutat. Res.* 1995, 334(3), 357-64 (Eng). Denaturing gradient electrophoresis (DGGE) and const. denaturant gel electrophoresis (CDGE) are methods based on sequence-detd. melting characteristics of DNA and thus detect different types of single base changes in the amplified fragments. Detection of 19 mutations in the human N-ras oncogene and 10 mutations in exon 3 of the Chinese hamster hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hprt) gene was studied using GC-clamped DGGE and CDGE. After allowing formation of heteroduplexes with the corresponding wild type sequence, all the mutations sep'd. from the wild type in at least one

concn. of the denaturants used in CDGE but two of the mutations in hprt exon 3 did not show sep'n. in any of the DGGE runs. Melting behavior of the mutant fragments was dependent, as expected, on both the type and the location of a mutation. Conditions are described allowing sep'n. of the mutations in the fewest possible DGGE and CDGE runs.

123: 134257f A new retroviral vector for detecting mutations and chromosomal instability in mammalian cells. Murata, Satoru; Matsuzaki, Tomoko; Takai, Setsuo; Yaoita, Hideo; Noda, Makoto (Department of Dermatology, Jichi Medical School, Minamikawachi, Kawachigun, Tochigi, Japan 329-04). *Mutat. Res.* 1995, 334(3), 375-83 (Eng). A retroviral vector carrying both forward (neo) and backward (herpes simplex virus thymidine kinase or HSV-TK gene) selection markers was constructed as a substrate for mutational assay in mammalian cells. The cells infected with this virus are first selected with G418, mutagenized and then selected with the anti-herpes drug acyclovir (ACV). Since HSV-TK, but not the host TK, is capable of converting ACV to a toxic metabolite, cells retaining the intact HSV-TK gene fail to survive, whereas the cells carrying a mutated HSV-TK gene or which have lost the gene can form colonies in the presence of ACV, making it possible to detect the genetic defects in a pos. manner. It is also possible to discriminate between small mutations and large deletions by checking the presence of the linked marker, neo. As a model expt., an uncloned pool of rat fibroblast cells (CREP) infected with this virus was prep'd. and irradiated with increasing doses of UV light. Dose-dependent increases in the no. of ACV-resistant colonies were obsd. Structural anal. of the HSV-TK gene in these clones revealed point mutations or small deletions in the majority of the cases. Since it requires no pre-existing genetic markers in the host cells, this system may be used for a wide variety of mammalian cells and provides a useful tool to assess both their susceptibility to various mutagens and their genomic instability.

123: 134258g Harvey murine sarcoma virus (MDR1) retroviral vectors: efficient virus production for foreign gene transduction using MDR1 as a selectable marker. Metz, Marianne Z.; Best, Dawn M.; Kane, Susan E. (Dep. Cell Tumor Biol., City of Hope Natl. Med. Cent., Duarte, CA 91010 USA). *Virology* 1995, 208(2), 634-43 (Eng). Retroviruses are used for a variety of applications requiring the delivery of exogenous genes to cells and animals. For many of these applications, including gene therapy, safer and more efficient retroviral vectors are needed. Vectors based on Harvey murine sarcoma virus (HaMSV) are attractive because nearly all their viral sequences outside of the LTRs are derived from rat endogenous VL30 retroviruses. These sequences are not homologous to the functional viral mRNAs in commonly used retroviral packaging cell lines, the packaging and dimerization domains of HaMSV are small and contain no splice donor sites, and the 5' sequences of HaMSV appear to confer efficient packaging and stability on genomic RNAs. HaMSV/MDR1 vectors use the human multidrug resistance gene as a dominant, selectable, amplifiable marker for gene delivery, but current versions of these vectors are large, with over 3300 nt of HaMSV sequences downstream of MDR1. We analyzed the requirement for these downstream sequences in HaMSV vectors and found that modified HaMSV/MDR1 vectors lacking virtually all viral sequences downstream of MDR1 support the prodn. of high-titer retroviruses and the efficient transduction, selection, and amplification of MDR1. A reduced-size HaMSV/MDR1 vector was further modified to include a second heterologous gene under the control of an internal SV40 promoter. Using MDR1 as a selectable marker, we obtained efficient virus prodn., gene transduction, and expression of MDR1 plus the heterologous gene.

123: 134259h DNA genotyping of  $\beta$ -lactoglobulin locus using PCR-RFLP as a selection aid for genetic improvement of dairy cattle. Chung, E. R.; Kim, W. T.; Han, S. K. (Coll. Agriculture, Sang Ji Univ., Wonju, 220-702 S. Korea). *Han'guk Ch'usok Han'gohoechi* 1994, 36(6), 606-12 (Eng). Genotypes of the  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) locus as a genetic marker linked to quantitative trait loci affecting traits of economic importance in dairy cattle were det'd. by the PCR-RFLP or AFLP method. Genomic DNA was prep'd. from blood of Holstein cows. The PCR was used to amplify a 262 bp region between nucleotides 367 and 629 from exon IV to intron IV of the bovine  $\beta$ -LG gene using forward primer (GRCCTTGTGCTGACACCGACTACA-3') and reverse primer (CAGGACACCGGCTCTGGTATATGA-3'). After amplification, PCR products were digested with Hae III restriction enzyme, and the fragments were sep'd. by agarose gel electrophoresis for RFLP or AFLP anal. of B alleles were identified with the Hae III restriction enzyme. The  $\beta$ -LG AA genotypes produced two fragments of 109 and 153 bp and the BB genotypes three fragments of 109, 79 and 74 bp. The AB genotypes showed the intermediate pattern. Thus, PCR amplification and RFLP anal. was shown to be a rapid and sensitive method for the discrimination of  $\beta$ -LG genotypes directly at the DNA level in dairy cattle of any age or sex. Consequently, the PCR-RFLP or AFLP method presented in this study can be used as a valuable tool for early selection of AI bulls and calves with the desirable  $\beta$ -LG gene or BB genotype affecting superior milk prodn. traits for genetic improvement of dairy cattle.

123: 134260b A novel gene mapping method for simultaneous in-situ hybridization and chromosome banding. Zhang, Yanming (Department Histology and Embryology, Zhejiang Medical University, Hangzhou, Peop. Rep. China). *Zhejiang Yike Daxue Xuebao* 1995, 24(2), 89-91 (Ch). A new method for simultaneous in-situ hybridization and chromosome banding for gene mapping was reported. It was simple, rapid and stable. Cells were cultured according to the routine method. In-situ hybridization was made.

After the del:  
banding was  
banding).  
and chromo  
two steps d  
clear-cut.  
detection o  
infected ho  
123: 13426  
high DNA  
[Erratum  
Wagner, M  
Karl-Hein:  
Munich.  
14153, 126  
the index e  
123: 1342  
using pol  
Hwang, D  
Dong-Gyu  
Cha, Chan  
110-799 S  
619-30 (I  
a promisi  
detection  
background  
appropria  
limitation  
pairs with  
human cy  
sensitivity  
amplify s  
polymers:  
the gene  
encoding  
was clon  
monoclon  
isolates, I  
virus ty:  
Epstein-  
pol and  
IEI and  
reaction  
PCR wi  
backgrou  
study is  
sensitive  
123: 13  
Mycoba  
Park, Y.  
Han; K  
Tubercu  
Misaneg  
the mos  
(MTB)  
been re  
drawbac  
primer  
and mp  
and M.  
microbi  
pro, a  
MTB I  
in clin  
IS 108  
resp.  
amplifi  
cases o  
1981.  
6:110 a  
or limi  
in add  
M. tut  
123:  
DNA  
polym  
Lee, I  
Inst.,  
29(3),  
techn  
beako  
tuber:  
123:  
and  
Fark  
Seem  
of M.  
Hick  
the c  
to m  
were  
were  
cyr-  
dura  
bed.  
Cay





Wah, Mak Joon (Biotechnology Centre, Institute Medical Research, Kuala Lumpur, 50588 Malay.). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996, 90(1), 40-1 (Eng). The nested polymerase chain reaction was very sensitive and accurate for detection of *Plasmodium falciparum* infection in Malaysia. The DNA primers were based on the 18S rRNA gene.

124:308700h Biolistic transformation of yeasts. Johnston, Stephen A.; DeVit, Michael J. (USA). *Methods Mol. Biol. (Totowa, N. J.)* 1996, 53(Yeast Protocols), 147-53 (Eng). Biolistic transformation is a unique process in which DNA or RNA is introduced into cells on micron-sized particles.

124:308701j Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, water, and feces by nested polymerase chain reactions and immunomagnetic separation. Kapperud, Georg; Vardund, Traute (National Institute Public Health, Oslo, Norway). *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1995, 13(Yersiniosis: Present and Future), 130-3 (Eng). The 2-step PCR of G. Kapperud et al. (1993), which is based on the use of 2 pairs of oligonucleotide primers in a nested configuration, is described for the detection of pathogenic *Y. enterocolitica* in meat samples, surface water, and feces. Immunomagnetic sepn., which uses small uniform paramagnetic particles coated with specific antibodies to surface antigens, was used to facilitate concn. and purifn. of the target bacteria from crude samples. The amplified PCR products were visualized by using a colorimetric detection method designated DIANA (detection of immobilized amplified nucleic acids) which eliminates the need for gel electrophoresis.

124:308702k Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction (rep-PCR) to fingerprint the genomes of *Frankia* isolates. Murry, Marcia A.; Zhang, Di; Schneider, Maria; De Bruijn, Frans J. (Michigan State University, East Lansing, MI 48824 USA). *Symbiosis* 1995, 19(2+3), 223-40 (Eng). Oligonucleotide primers complementary to consensus sequence motifs of repetitive elements common to prokaryotic genomes, REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), and BOX elements, were used to amplify intervening sequences of *Frankia* genomic DNA using the polymerase chain reaction (termed rep-PCR). The PCR reaction products were sepd. electrophoretically producing a complex banding pattern or fingerprint that was characteristic of each strain. Members of the same genomic species were found to display similar fingerprints, but the rep-PCR technique was sensitive enough to distinguish closely related strains and provides an effective means to rapidly differentiate between *Frankia* isolates at the sub-species level.

124:308703m Short report: Development of a new diagnostic method for *Plasmodium falciparum* infection using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Abdullah, Noor Rain; Furuta, Takahisa; Taib, Radzan; Kita, Kiyoshi; Kojima, Somei; Wah, Mak Joon (Biotechnology Center, Institute Medical Research, Kuala Lumpur, Malay.). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 54(2), 162-3 (Eng). We describe here a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of malaria parasites. Ten in vitro-cultured isolates of *Plasmodium falciparum* and 16 specimens from patients infected with *P. falciparum* were used to examine the specificity and sensitivity of the test. The sensitivity of the test was 0.3 parasites/ $\mu$ L blood. Specificity was detd. by matching the sequences of the specimens' DNA to published sequences of 18S rRNA genes in the species-specific region. The test proved to be very sensitive and specific for the detection of *P. falciparum* infection.

124:308704n Rapid detection of pyrimethamine susceptibility of *Plasmodium falciparum* by restriction endonuclease digestion of the dihydrofolate reductase gene. Zindrou, Sherwan; Dao, Le Duc; Xuyen, Pham Thi; Dung, Nguyen Phuong; Sy, Nguyen Duy; Skold, Ola; Swedberg, Gote (Faculty Pharmacy, Uppsala University, Uppsala, Swed.). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 54(2), 185-8 (Eng). A rapid and simple method to detect pyrimethamine susceptibility of *P. falciparum* by analyzing DNA from whole blood is presented. Samples from cultured isolates and from patients infected with *P. falciparum* were spotted onto filter paper disks, dried, and stored for subsequent analyses. After extg. the *P. falciparum* DNA using Chelex-100 ion-chelating resin (Bio-Rad, Richmond, CA), the polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the dihydrofolate reductase (dhfr) gene. The PCR product of 727 basepairs was digested with the AluI restriction endonuclease to det. whether the isolates were sensitive or resistant to the antimalarial drugs pyrimethamine and cycloguanil. This restriction endonuclease digests only DNA from pyrimethamine-sensitive parasites because the recognition locus of AluI is changed by mutations giving rise to pyrimethamine and cycloguanil resistance. This method is simple and sensitive and could therefore be used to study the epidemiol. of pyrimethamine resistance in *P. falciparum*. The DHFR gene of pyrimethamine-resistant clones from Vietnamese patients showed 3 amino acid changes that were previously found in pyrimethamine-resistant isolates. Two other clones, T9/94 and T9/96, originally isolated from a single malaria patient from Thailand, had different DHFR gene sequences. The nucleotide sequence of the DHFR gene from T9/96 was identical to the wild-type DHFR sequence, whereas T9/94 possessed amino acid substitutions at positions 16 and 108 that have been described in cycloguanil-resistant parasites.

124:308705p Detection of RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2a and familial medullary thyroid carcinoma by denaturing gradient gel electrophoresis. Peacock, Michael L.; Borst, Marilyn J.; Sweet, Jason D.; Decker, Ruth A. (Medical Center, University Michigan, Ann Arbor, MI 48109 USA). *Hum. Mutat.* 1996, 7(2), 100-4 (Eng). Germline missense mutations within the coding region

of the RET proto-oncogene have recently been described in patients with the dominantly inherited cancer syndromes, multiple endocrine neoplasia type 2a (MEN 2a) and familial medullary thyroid carcinoma (FMTC). To date, the sequence variations occur in RET exons 10 and 11 and alter highly conserved cysteine residues in the proposed extracellular domain at codons 609, 611, 618, 620, and 634. To expedite rapid screening of populations at risk of MEN 2a or FMTC, the authors developed a PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) strategy that detects polymorphisms occurring at all five Cys codons in both RET exons using identical gel conditions. In this report, the screening results from DGGE anal. of 15 distinct MEN 2a and FMTC mutations are shown. Each mutation generated a clearly distinguishable and unique homo- and heteroduplex band pattern. Given the highly efficient, reproducible, and sensitive nature of this approach, DGGE is particularly appropriate for rapid, large-scale screening of patients. Since prior knowledge of the RET mutation is unnecessary for anal., DGGE is potentially valuable for distinguishing germline from seemingly sporadic medullary thyroid cancer as well as identifying novel sequence changes.

124:308706q Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the  $\alpha$ -globin genes by DGGE and SSCA. Harteveld, Kees L.; Heister, Angelien J. G. A. M.; Giordano, Piero C.; Losekoot, Monique; Bernini, Luigi F. (Department Human Genetics (MGC), State University Leiden, 2333 AL Leiden, Neth.). *Hum. Mutat.* 1996, 7(2), 114-22 (Eng). The authors report the application of DGGE and SSCA for the identification of point mutations causing  $\alpha$ -thalassaemia. The  $\alpha$ -globin genes were amplified in three overlapping fragments of 250 bp (I), 540 bp (II), and 600 bp (III), resp. Fragments II and III were analyzed by DGGE, while fragments I and II were analyzed by SSCA. A panel of seven previously identified mutations was employed to test the combined DGGE/SSCA strategy: 5/5 and 6/7 mutations were detected by SSCA and DGGE, resp. The same approach has also led to the identification of eight disease-causing mutations in a sample of 18 presumed non-deletional  $\alpha$ -thalassaemia carriers. During this pilot study, two novel mutations as well as three new polymorphisms were found. The combined application of SSCA and DGGE allows the rapid identification of mutations responsible for  $\alpha$ -thalassaemia and abnormal globin chain variants. Moreover, it will prove extremely useful for pre- and postnatal diagnosis and in screening programs for non-deletional  $\alpha$ -thalassaemias.

124:308707r Mass allele detection (MAD) of rare 5-HT<sub>1A</sub> structural variants with allele-specific amplification and electrochemiluminescent detection. Bergen, Andrew; Wang, Chang-Yu; Nakhai, Bita; Goldman, David (National Institute Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes Health, Rockville, MD USA). *Hum. Mutat.* 1996, 7(2), 135-43 (Eng). A strategy is described that exploits allele-specific amplification (ASA-PCR) and electrochemiluminescence (ECL) detection technol. to rapidly and cheaply screen large nos. of DNAs arranged in pooled matrixes to identify individual nucleotide sequence variants. To demonstrate this strategy, a large genomic DNA collection was screened for two nucleotide variants in the 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor gene and individual heterozygotes were identified. Conversion of two SSCP variants to allele-specific PCR polymorphisms was accomplished, and PCR product capture and ECL detection were enabled by the covalent addn. of biotin to allele-specific PCR primers and ruthenium to the nonspecific PCR primer. A 2-level DNA pooling strategy was used to reduce the no. of individual PCR reactions required. Pooling expts. established that ASA-PCR with ECL detection is sufficiently sensitive to reproducibly detect a single specific allele in the presence of a 40-fold excess of genomic DNA from individuals neg. for the specific allele. The detection sensitivity of the ECL device and the design of the pooled DNA arrays reduced the no. of PCRs required to detect the rare individuals with the variant sequences by ~90%. This strategy is called mass allele detection (MAD).

124:308708s Advantages of RT-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of genomic imprinting: Detection of new mouse and human expressed polymorphisms. Nakao, Mitsuyoshi; Sutcliffe, James S.; Beaudet, Arthur L. (Department Molecular and Human Genetics, Baylor College Medicine, Houston, TX 77030 USA). *Hum. Mutat.* 1996, 7(2), 144-8 (Eng). Genomic imprinting, or differential expression of alleles based on parental origin, is documented for numerous mouse and human loci and is implicated in various phenotypes such as Wilms tumor, Beckwith-Wiedemann syndrome, Prader-Willi syndrome, and Angelman syndrome. Improved methods would facilitate the anal. of imprinting, and we describe a simple strategy designed to analyze transcripts for imprinting in mouse and human using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in combination with GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). As a demonstration, novel polymorphisms in the untranslated portions of mRNA between CBA/NJ and Skive strains of mice were identified and used to document paternal expression of small nuclear ribonucleoprotein assoc. polypeptide N (Snrpn) in brain, maternal expression of H19 in liver, and biallelic expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapd) in liver. The method was also used to demonstrate a new polymorphism and monoallelic expression of H19 in human peripheral leukocytes. Assessment of imprinting for novel or unstudied transcripts requires identification and anal. of polymorphisms at the RNA level, and we believe that RT-PCR with DGGE is a preferred method for this application, with advantages over nuclease protection and other methods.

124:308709t Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction. Zhu, Q.; Lim, C. K.; Chan, Y. N. (Department Microbiology,





National University Singapore, Singapore, Singapore 0511). *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 80(3), 244-51 (Eng). A rapid and sensitive method for detection of *Salmonella typhi* would help in preventing the spread of outbreaks and in clin. diagnosis. In order to develop unique PCR primers to detect *S. typhi*, rRNA genes from *S. typhi* were cloned in pUC18. The resulting clone was confirmed by sequencing. The cloned DNA fragment contained the 5 S, part of the 23 S rRNA genes, and the 5S-23 S spacer region (EMBL/GenBank accession No. U04734). It was expected that the 5 S-23 S spacer region is divergent unlike the highly conserved 23 S + 5 S genes. This was confirmed by comparison with the rRNA gene sequences in the EMBL/GenBank database. A pair of PCR primers specific for *S. typhi* was obtained, based on this spacer region sequence. The specificity of this pair of primers was tested with 54 *S. typhi* strains (of 27 different phage types). All these *S. typhi* strains showed the pos. 300-bp PCR product with this pair of primers. Six other *Salmonella* species as well as 6 other non-*Salmonella* bacteria were tested and none showed the 300-bp PCR product. The sensitivity of the detection level was 0.1 pg of pure *S. typhi* genomic DNA, or ~40 *S. typhi* cells in a spiked food sample. This pair of primers therefore has the potential for development into a diagnostic tool for the rapid diagnosis of typhoid fever.

124:308710m Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. Nakajima, Noriko; Hijikata, Minako; Yoshikura, Hiroshi; Shimizu, Yoshiko K. (Dep. Bacteriol., Fac. Med., Univ. Tokyo, Tokyo, Japan 113). *J. Virol.* 1996, 70(5), 3325-9 (Eng). The human T- and B-cell lines HPMa10-2 and Daudi produced infectious hepatitis C virus (HCV) for more than 1 yr after infection. The infectivity titer of the cell culture-grown HCV and its genome titer were comparable. The virion d. in sucrose was around 1.12 g/mL. Among the 13 variants detected in the inoculum, 7 were adsorbed by the cells and one particular HCV sequence which was present in minor quantities in the inoculum persisted.

124:308711n Sequence analysis of the 2nd intron revealed common sequence motifs providing the means for a unique sequencing based typing protocol of the HLA-A locus. Blasczyk, R.; Wehling, J.; Weber, M.; Salama, A. (Virchow-Klinikum, Humboldt-Universitaet zu Berlin, Germany). *Tissue Antigens* 1996, 47(2), 102-10 (Eng). The authors here present a sequencing strategy for the HLA-A locus which is generally applicable for all HLA class I genes. The typing strategy is based on a group-specific amplification according to the serol. defined antigens. The PCR products carry the typing-relevant polymorphic regions of the 2nd and 3rd exon including the 2nd intron. The sequencing primers were designed to match conserved sequence motifs in the 2nd intron allowing a nested sequencing approach in 3' and 5' direction. These conserved regions were identified after sequence compilation of the 2nd intron of 143 clin. samples and 48 cell lines mostly from the 9th and 10th IHWK representing all serol. defined groups of alleles. This strategy allowed the use of only one 5' and one 3' sequencing primer regardless of the amplified allele. Therefore, it was possible to use dye terminator as well as dye primer sequencing chem. The amplification strategy allowed the sepn. of the haplotypes in almost all cases. Thus, an assignment of heterozygous positions requiring high sequencing quality was not necessary, allowing the application of Sequenase as well as Taq Polymerase as sequencing enzyme. Concerning the resolu. of heterozygosity it is obvious that this approach is superior to a typing system using a single pair of generic primers followed by direct sequencing, since the latter technique is not capable of defining the cis/trans linkage of polymorphic sequences and, hence, cannot exclude the presence of unknown alleles.

124:308712p PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. Harrison, N. A.; Richardson, P. A.; Tsai, J. H.; Ebbert, M. A.; Kramer, J. B. (IFAS, University of Florida, Fort Lauderdale, FL 33314 USA). *Plant Dis.* 1996, 80(3), 263-9 (Eng). DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the phytoplasma assoc. with maize bushy stunt (MBS) disease. A pair of oligonucleotide primers was synthesized according to partial sequences of a cloned 1-kb fragment of genomic DNA of the MBS phytoplasma (Texas isolate) maintained in sweet corn. PCR performed for 30 cycles with primer annealing at 61° amplified a DNA product of about 740-bp in reaction mixts. contg. template DNA derived from symptomatic corn singly infected with MBS phytoplasma isolates from either Texas, Florida, Costa Rica, or Mexico. No comparable product was amplified from DNAs of healthy corn, plants affected by various other phytoplasmal diseases, or from *Spiroplasma kunkelii*. Forty cycles of PCR enabled detection of a Florida isolate of the MBS phytoplasma in all leaf and stalk samples tested from presymptomatic plants 12 days after plants were fed upon by inoculative vector *Dalbulus maidis* leafhoppers and in the majority of nonvector *Peregrinus maidis* planthoppers after 1 to 5 days of exposure to symptomatic plants.

124:308713q Evaluation of primer pairs for the reliable diagnosis of paulownia witches'-broom disease using a polymerase chain reaction. Nakamura, H.; Yoshikawa, N.; Takahashi, T.; Sashiki, N.; Kubono, T.; Shoji, T. (Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Japan 020). *Plant Dis.* 1996, 80(3), 302-5 (Eng). To establish a reliable method for detection of paulownia witches'-broom (PWB) phytoplasma by a polymerase chain reaction (PCR), several oligonucleotide primers that amplify ribosomal protein (rp) or 16S rRNA (rD) genes of PWB-phytoplasma were compared for their specificity and sensitivity in the amplification of PWB-specific fragments by PCR. Use of rp primer pairs for PCR resulted in amplified DNA fragments of expected sizes in samples from diseased leaves. A fragment was ampli-

fied from healthy samples using one primer pair (rp3/rp4), but the fragment size was different from disease-specific fragments. In contrast, all four rD primer pairs designed for the 16S rRNA gene amplified both PWB-specific DNA fragments from infected leaf samples and nonspecific fragments of the same size as PWB-specific fragments from healthy samples. Using the rp3/rp4 primer pair, the authors amplified a PWB-specific DNA fragment from 150 pg of nucleic acid samples. This method allowed detection at the 95% confidence level of PWB-phytoplasma from paulownia leaves from the ten asymptomatic infected trees used in this study when at least 3 leaves randomly collected in Sept. were used.

124:308714r Investigation of outbreaks of *Enterobacter aerogenes* colonization and infection in intensive care units by random amplification of polymorphic DNA. Davin-Regli, A.; Saux, P.; Bollet, C.; Gouin, F.; De Micco, P. (Laboratoire d'Hygiene et de Microbiologie, Hopital Salvator, 13009 Marseille, Fr.). *J. Med. Microbiol.* 1996, 44(2), 89-98 (Eng). During a 4-mo period, 41 isolates of *Enterobacter aerogenes* were cultured from different specimens from a 14-bed intensive care unit (ICU1). These were obtained from 12 patients out of a total of 187 patients admitted to the ICU. Sixteen *E. aerogenes* isolates were cultured from another ICU (ICU2) 6 mo later. Six non-outbreak-assoc. strains were included as controls and all the isolates were compared by random amplification of polymorphic DNA (RAPD), with three different 10-mer oligonucleotide primers. The six non-outbreak-assoc. strains were distinguishable by RAPD with two of the three primers. RAPD fingerprinting with primer AP12h was as discriminatory as the combined results from all three primers and defined 22 different patterns for the 41 isolates from the ICU1. In nine instances, isolates with indistinguishable RAPD patterns were detected in two-to-five patients over a 3-15-day period, suggesting patient-to-patient transmission. During their stay in ICU1, patients harboured one-to-12 distinguishable isolates. Isolates from ICU2 were indistinguishable by RAPD anal. with the three different primers. These findings suggest that the cluster of colonizations and infections in ICU1 was a 'false outbreak', consisting of successive patient-to-patient transmission of different *E. aerogenes* strains. In contrast, the outbreak on ICU2 probably involved the extensive spread of a single strain.

124:308715s Mutation detection and genetic counseling in retinoblastoma using heteroduplex analysis. Zhang, Qingqiong; Minoblastoma, Kensei (Ichihara Hospital, Teikyo University, Chiba, Japan 299-01). *Jpn. J. Ophthalmol.* 1995, 39(4), 432-7 (Eng). Gene diagnosis is essential for confident presymptomatic prediction, genetic counseling, and early management of hereditary retinoblastoma. In screening the leukocyte DNA of three patients with bilateral retinoblastoma for RB1-gene heterozygous germline mutations, we identified mutations involving exon 3 or 18 of the RB1 gene by using heteroduplex anal. and sequencing. In one case the mutation was a 2 bp GT deletion resulting in the loss of the exon 18 splicing-donor; another mutation was a G-to-T transversion at codon 580 in exon 18, which converts Arg to a stop codon. The third mutation involved a 1 bp deletion at codon 96 in exon 3, which leads to a premature stop codon at codon 110. We used information from this heteroduplex technique for genetic counseling and presymptomatic prediction. A newborn was identified as normal, using gene diagnosis; his 15-mo follow-up confirmed our prediction.

124:308716f RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. Silva, W. P. K.; Multani, D. S.; Deverall, B. J.; Lyon, B. R. (Department of Crop Sciences, University of Sydney, 2006 Australia). *Aust. J. Bot.* 1995, 43(6), 609-18 (Eng). Genetic variability in isolates of the fungal plant pathogen *Corynespora cassiicola* cultured from pawpaw, mimosa and thyme hosts was assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) anal. of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA and random amplified polymorphic DNA (RAPD) anal. of total fungal DNA. Strains of *Corynespora* could be distinguished from a member of the closely-related genus *Helminthosporium* on the basis of amplified ITS fragment size, but could not be typed individually as the ITS regions of all isolates exhibited identical size and restriction endonuclease digestion pattern. However, RAPD profiles generated by 14 decamer primers of arbitrary sequence did reveal significant differences between some of the *C. cassiicola* isolates and succeeded in differentiating all but two of the strains. Cluster anal. of 218 amplified DNA fragments showed that the five isolates could be placed into three groups that correspond with their host origin and morphol. characteristics. The use of these mol. techniques will be extended to assess intra-specific variation in *C. cassiicola* isolates from rubber trees in Sri Lanka, where highly pathogenic strains present a serious threat to the natural rubber industry.

124:308717u Prenatal diagnosis for recessive dystrophic epidermolysis bullosa in 10 families by mutation and haplotype analysis in the type VII collagen gene (COL7A1). Christiano, Angela M.; LaForgia, Sal; Paller, Amy S.; McGuire, Joseph; Shimizu, Hiroshi; Uitto, Jouni (Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA USA). *Mol. Med. (Cambridge, Mass.)* 1996, 2(1), 59-76 (Eng). Epidermolysis bullosa (EB) is a group of heritable diseases that manifest as blistering and erosions of the skin and mucous membranes. In the dystrophic forms of EB (DEB), the diagnostic hallmark is abnormalities in the anchoring fibrils, attachment structures beneath the cutaneous basement membrane zone. The major component of anchoring fibrils is type VII collagen, and DEB has been linked to the type VII collagen gene (COL7A1) at 3p21, with no evidence for locus heterogeneity. Due to life-threatening complications and significant long-term morbidity assoc. with the severe, mutilating form of recessive



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/23606 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08813

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. September 2000 (08.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 45 916.9 24. September 1999 (24.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE];  
Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRABOWSKI, Reiner  
[DE/DE]; Theodor-Heuss-Str. 39, 37075 Göttingen (DE).  
BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländer Weg 85,  
12355 Berlin (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCK-  
MAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstr. 58,  
80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/23606 A2

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES FOR DETECTING BACTERIA AND PHYLOGENETIC UNITS OF BACTERIA

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN UND PHYLOGENETISCHEN EIN-  
HEITEN VON BAKTERIEN

(57) Abstract: The present invention relates to nucleic acid molecules which allow the identification of bacteria or bacteria groups.  
The region containing 23S/5S rRNA and pertaining to the bacterial genome is used as the target sequence for detecting the bacteria.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die die Identifikation von Bakterien oder Bak-  
teriengruppen ermöglichen. Bei dem Nachweis wird die 23S/5S rRNA enthaltende Region des bakteriellen Genoms als Zielsequenz  
für den Bakteriennachweis eingesetzt.



## **Nukleinsäuremoleküle zum Nachweis von Bakterien und phylogenetischen Einheiten von Bakterien**

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die die Identifikation von Bakterien oder Bakteriengruppen ermöglichen.

Bakterien sind ein allgegenwärtiger Bestandteil der menschlichen Umwelt. Sie verursachen jedoch als Lebensmittelverderber oder Krankheitserreger so häufig Probleme, daß einer effektiven, schnellen und zuverlässigen Diagnostik sehr große Bedeutung zukommt.

Zu den wichtigsten Mikroorganismen, die Lebensmittel verderben gehören *Clostridium Botulinum*, der Erreger des Botulismus, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum*, enteropathologische *Escherichia coli* Stämme, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellen* Spezies, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus* und *Yersinia enterocolitica*. In den USA hat das General Accounting Office (GAO) 1996 berichtet, daß 6,5-81 Millionen Fälle von Lebensmittelvergiftung jährlich vorkommen. Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) schätzt, daß 2-3 % aller Lebensmittelvergiftungen zu sekundären chronischen Erkrankungen führt. Es wird außerdem geschätzt, daß jedes Jahr 2-4 Millionen Erkrankungen in den USA durch mehr als 2000 *Salmonella* Stämme verursacht werden. Diese Schreckensstatistik ließe sich für andere Lebensmittelverderber beliebig verlängern. Lebensmittelvergiftungen verursachen jedoch nicht nur menschliches Leid, im Extremfall den Tod, sondern auch einen beträchtlichen ökonomischen Schaden. Dieser wird in den USA für 1991 z.B. auf 5,6-9,4 Milliarden \$ geschätzt.

Es ist allgemein bekannt, daß von Mikroorganismen als Infektionserreger große Gefahren ausgehen, die in ihrem Potential kaum abzuschätzen sind. Statistische Größenordnungen werden z.B. vom Weltgesundheitsbericht der WHO reflektiert. So waren 1998 Infektionserreger, inklusive Parasiten, für 9,8 Millionen Todesfälle verantwortlich (ohne prä- oder postnatale Infektionen), was einem Anteil von 18,2 % an allen krankheitsbe-

dingten Todesfällen entspricht. Die gefährlichen Erreger lassen sich nicht so gut zusammenfassen wie die Lebensmittelverderber, da sie sich aus vielen phylogenetischen Zweigen der Eubakterien rekrutieren. Ein besonders großes "infektiöses Potential" besteht vor allem innerhalb der Familie der Enterobakterien.

Im Kampf gegen humanpathogene Bakterien besteht ein wesentlicher Schritt in der Identifizierung des für eine Krankheit oder ein pathologisches Symptom ursächlichen Keims. Häufig können erst nach der Identifizierung geeignete medizinische Maßnahmen ergriffen werden. Darüber hinaus können gut funktionierende Nachweismethoden für Bakterien als präventive Werkzeuge der Qualitätssicherung von Lebensmitteln eingesetzt werden.

Der klassische Nachweis von Bakterien besteht in der mikrobiologischen Identifizierung, die in der Regel eine Vereinzelung auf Agar-Agar-haltigen selektiven Medien umfaßt. Dieses Verfahren hat jedoch zwei wesentliche Nachteile: erstens ist der Nachweis häufig nicht zuverlässig oder spezifisch. Zweitens benötigen viele Bakterien eine Wachstumszeit von mindestens 18 Stunden zur Vereinzelung als Kolonie. In vielen Fällen ist zudem eine Sekundärvereinzelung oder ein Sekundärnachweis erforderlich. Alles in allem sind dann Diagnosezeiten von bis zu einer Woche keine Seltenheit. Darüber hinaus gibt es auch pathogene Keime, die sich nicht kultivieren lassen (J.J. Byrd et al. 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57, 875-878). In Zeiten schneller Transportwege und globalen Warenverkehrs sind jedoch schnelle diagnostische Verfahren, die im optimalen Fall nicht länger als 24 h dauern, essentiell, um eine Verbreitung Krankheitserregern oder global gestreute Lebensmittelvergiftungen aus nur einer lokalen Quelle zu verhindern.

Um modernen Anforderungen gerecht zu werden wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Verfahren entwickelt, die eine schnelle und zuverlässige routinemäßige Identifizierung von Keimen leisten sollen. So nutzen z.B. immunologische Methoden die spezifische Bindung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper an bakterielle Oberflächenantigene. Solche Verfahren werden insbesondere zur Serotypisierung, z.B. von *Salmonellen* verwendet. Im allgemeinen ist der Nachweis mit einem ELISA zwar relativ schnell, verlangt jedoch die Prozessierung und Isolierung des jeweiligen Antigens, was

mit vielen Problemen behaftet sein kann. Als besonders leistungsfähig erwiesen sich bakterielle Nachweismethoden, die sich DNA-Sonden bedienen, denn sie sind sehr sensitiv, relativ spezifisch und lassen sich in einem experimentellen zeitlichen Gesamtrahmen von 2-3 Tagen zum Nachweis von Mikroorganismen nutzen.

### Hintergrund der Erfindung

Die Erfindung besteht in der Bereitstellung spezifischer DNA-Sequenzen und in der Auswahl von DNA-Regionen, die zum Nachweis von Bakterien besonders geeignet sind. Dieser Anwendung liegt also die Identifikation von Organismen anhand ihrer Erbinformationen zugrunde. Abweichungen in der Nukleotidsequenz bestimmter DNA-Bereiche in mindestens einem einzigen Baustein können bereits zur Differenzierung von Spezies genutzt werden.

Historisch betrachtet wurden ribosomale RNA Gene bereits für die phylogenetische Einordnung von Organismen genutzt. Sequenzvergleiche von 5S und 16S ribosomalen Genen verschiedener Bakterien führten zu beträchtlichen Korrekturen bei verwandtschaftlichen Zuordnungen und zur Entdeckung des Reiches der Archaeobacteria. Aufgrund ihrer Größe und dem dementsprechend hohen Sequenzieraufwand wird die 23S RNA erst in den letzten Jahren zum Zwecke systematischer Einteilungen genutzt.

In praktischen Anwendungen war die direkte Sequenzierung von Genen zu identifizierender Mikroorganismen zu aufwendig und zeitraubend. In den 80er Jahren wurden deshalb insbesondere Nukleotidsonden zum Nachweis von Bakterien verwendet. Diese können zwar eine sehr gute Spezifität aufweisen, die Nachweisgrenze ist jedoch häufig zu niedrig. Eine entscheidende Verbesserung erfuhr die Sondentechnologie in der Kombination mit Amplifikationstechniken, die also die nachzuweisende Nukleotidsequenz vermehren und dadurch die Sensitivität des Nachweises beträchtlich erhöhen. So ist es möglich im Extremfall ein einziges isoliertes Genom nachzuweisen. In der Praxis treten bei der Isolierung von DNA Verluste auf, die die Nachweisgrenze der Zellzahl auf ca.  $10^2$  bis  $10^4$  erhöhen.

Basierend auf Arbeiten der Grundlagenforschung wurden DNA-Sonden aus den 5S-, 16S- und 23S-Genen zur praktischen Anwendung genutzt. Erwähnt werden können z.B. die Patente Nietupski et al. (US 5,147,778) zur Detektion von Salmonella, Mann und Wood (US 6,554,144) zur Detektion von Yersinia Spezies, Leong (EP 0479117 A1) zur Detektion verschiedener gramnegativer und grampositiver Bakterien, Carico et al. (EP 133671 B1) zur Detektion verschiedener enterobakterieller Spezies, Shah et al. (EP 0339783 B1) zur Detektion von Yersinia enterocolitica, Carrico (EP 0163220 B1) zur Detektion von Escherichia coli, Hogan et al. (WO 88/03957) zur Detektion von Spezies der Enterobakterien, Mycobacterium, Mycoplasma und Legionella, Leiser et al. (WO 97/41253) zur Detektion verschiedener Mikroorganismen, Grosz und Jensen (WO 95/33854) zur Detektion von Salmonella enterica, Stackerbrandt und Curiaie (EP 0314294 A2) zur Detektion von Listeria monocytogenes, Wolff et al. (EP 0408077 A2), Hogan und Hammond (US 5681698) zum Nachweis von Mycobacterium kansasii, Hogan et al. (US 5 679 520) zum Nachweis verschiedener Bakterien, Kohne (US 5 567 587) insbesondere zur Detektion von bakterieller rRNA, Kohne (US 5 714 324) zur Detektion verschiedener Bakterien, Pelletier (WO 94/28174) zum Nachweis von Legionella und Kohne (US 5 601 984) zum Nachweis verschiedener Bakterien. Das Gros der Patentschriften bezieht sich dabei auf die Sequenz des 16 S rDNA-Gens, viele auch auf die 23 S rDNA.

Es zeigte sich jedoch, daß letztere Gene für viele Differenzierungsleistungen in der praktischen Anwendung nicht geeignet sind, da sie zu stark konserviert sind. Insbesondere nahe verwandte Mikroorganismen lassen sich nicht unterscheiden. Auf der anderen Seite wurde das 5 S rDNA-Gen in der Grundlagenforschung auf Grund der geringen Größe ursprünglich zwar für phylogenetische Studien genutzt, in der praktischen Anwendung ist es jedoch in der Regel zu variabel und das Differenzierungspotential zu gering.

Da 5 S, 16 S und 23 S rDNA-Gene als diagnostische Hilfsmittel mit vielen Nachteilen behaftet sind, wurde nach DNA-Regionen gesucht, die zur Identifizierung aller Eubakterien herangezogen werden können. Eine solche DNA-Region sollte sehr variable und zu-



gleich stark konservierte Sequenzen aufweisen. Die variablen Bereiche wären dann zur Differenzierung nahe verwandter Spezies, wie Stämme und Arten, geeignet. Die konservierten Sequenzabfolgen wären zum Nachweis entfernt verwandter Bakterien oder von höheren taxonomischen Einheiten zu nutzen.

Im Kontext ausgedehnter Studien über ribosomale Operons wurde auch der 16 S-23 S-transkribierte Spacer in jüngster Vergangenheit in der Literatur diskutiert; die Anwendbarkeit in der systematischen Bakteriologie jedoch in Frage gestellt. So sehen Nagpal et al. (J. Microbiol. Meth. 33, 1998, S. 212) die Nutzbarkeit dieses Spacer äußerst kritisch: Ein besonderes Problem dieses transkribierten rDNA-Spacers liegt vor allem auch darin, daß er häufig tRNA-Insertionen enthält. Solche Insertionen stellen dramatische Sequenzabweichungen dar, und haben nicht notwendigerweise eine Relation zu phylogenetischen Abständen. Sie wurden jedoch in der Vergangenheit genutzt, um den durch sie verursachten Längenpolymorphismus als phylogenetisches Charakteristikum heranzuziehen (Jensen et al. 1993, Appl. Envir. Microb. 59, 945-952, Jensen, WO 93/11264, Kur et al. 1995, Acta Microb. Pol. 44, 111-117).

Eine alternative Zielsequenz zur Identifizierung von Bakterien besteht in dem transkribierten Spacer zwischen 23 S und 5 S rDNA. So publizierten Zhu et al. (J. Appl. Bacteriol. 80, 1996, 244-251) den Nachweis von *Salmonella typhi* mit Hilfe dieser diagnostischen DNA-Region. Die generelle Nutzbarkeit dieses Spacers zum Nachweis auch anderer Bakterien läßt sich aus dieser Arbeit aber nicht ableiten. Es gibt sehr viele Beispiele, die zeigen, daß eine DNA-Region nur zur Identifikation einer oder weniger bakterieller Spezies geeignet ist. Einzelne Patente implizieren eine mögliche, doch sehr begrenzte Anwendbarkeit des 23 S-5 S transkribierten DNA-Bereichs für die bakterielle Diagnostik. Sie alle haben gemeinsam, daß ihre Anwendbarkeit sich nur auf eine bakterielle Spezies bezieht, und zwar auf den Nachweis von Legionellen (Heidrich et al., EP 0739988 A1), von *Pseudomonas aeruginosa* (Berghof et al., DE 19739611 A1) und auf den Nachweis von *Staphylococcus aureus* (Berghof et al., WO 99/05159).

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, Materialien und Verfahren anzugeben, die es ermöglichen, ein beliebiges Bakterium (vorzugsweise aus der Gruppe der Enterobakterien) in einem Untersuchungsmaterial nachzuweisen.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäuremolekül als Sonde und/oder Primer zum Nachweis von Bakterien, ausgewählt aus

- a) einer Nukleinsäure, umfassend, mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID Nrn. 1 bis 530 und/oder eine Sequenz aus Position 2667 bis 2720, 2727 bis 2776, 2777 bis 2801, 2801 bis 2832, 2857 bis 2896, 2907 bis 2931, 2983 bis 2999 und/oder 3000 bis 3032 gemäß SEQ ID Nr. 1; bzw. hierzu homologen Nukleinsäuren,
- b) einer Nukleinsäure, die spezifisch mit einer Nukleinsäure nach a) hybridisiert;
- c) einer Nukleinsäure, die 70 %, vorzugsweise mindestens 90 % Identität zu einer Nukleinsäure nach a) oder b) aufweist,
- d) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach a) bis c) ist und/oder

Kombinationen der genannten Nukleinsäuren nach a) bis d), ausgenommen die SEQ ID No 1.

Die weiteren Ansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Vorliegen von Enterobakterien in einer Analysenprobe nachgewiesen, indem die Analysenprobe mit einer Sonde in Kontakt gebracht wird, die das Vorliegen einer Nukleinsäure aus dem 23S/5S rDNA Genomabschnitt der Enterobakterien nachweist.

Die in Anspruch 1 angegebene Sequenz mit der Nr. 1 stammt aus *E. Coli*. Homologe DNA Sequenzen sind solche, die anderen Bakterien als die gezeigte *E. Coli* Sequenz entstammen, wobei jedoch der Genomabschnitt der anderen Bakterien dem der SEQ ID

Nr. 1 zugrundeliegenden Sequenz entspricht. Für nähere Einzelheiten wird auf die noch folgende Definition der homologen DNA Sequenzen verwiesen.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül umfaßt vorzugsweise mindestens 10 Nukleotide, besonders bevorzugt mindestens 14 Nukleotide. Nukleinsäuremoleküle dieser Länge werden vorzugsweise als Primer eingesetzt, während als Sonde verwendete Nukleinsäuren vorzugsweise mindestens 50 Nukleotide umfassen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können auch Nukleotide der Sonde bzw. des Primers ersetzt sein durch modifizierte Nukleotide, enthaltend z. B. angefügte Gruppen, die letztlich einer Nachweisreaktion dienen. Besonders bevorzugte Derivatisierungen sind in Anspruch 4 angegeben.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Kombinationen der genannten Nukleinsäuremoleküle eingesetzt. Die Zusammenstellung der Kombination aus Nukleinsäuremolekülen gestattet es, die Selektivität der Nachweisreaktion festzulegen. Dabei können durch Auswahl der Primerkombinationen und/oder Sondenkombinationen die Bedingungen der Nachweisreaktion so festgelegt werden, daß diese entweder generell das Vorhandensein von Bakterien in einer Probe nachweisen oder aber spezifisch das Vorhandensein einer bestimmten Bakterienspezies anzeigt.

Ein erfindungsgemäßer Kit enthält mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure zusammen mit den weiteren üblichen Reagenzien, die bei Nukleinsäurenachweisen eingesetzt werden. Hierzu zählen u. a. geeignete Puffersubstanzen und Nachweismittel wie Enzyme, mit denen beispielsweise gebildete biotinylierte Nukleinsäurehybride nachgewiesen werden können.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform, hierin auch als Konsensus PCR bezeichnet, wird das Verfahren gemäß Anspruch 8 durchgeführt. Dabei wird zunächst durch den Einsatz konservierter Primer (diese hybridisieren an Nukleinsäuren verschiedener bakterieller taxonomischer Einheiten) ein Nukleinsäurefragment amplifiziert und durch den Einsatz weiterer spezifischerer Nukleinsäuren (diese hybridisieren nur noch

mit wenigen taxonomischen Einheiten oder nur einer bestimmten Spezies) werden dann spezifischere Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen. Letztere erlauben dann den Rückschluß auf das Vorhandensein einer bestimmten Gattung, Art oder Spezies in der Analysenprobe.

In den eingesetzten Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure können die verschiedensten etablierten Nachweise verwendet werden. Hierzu zählen Southern Blot-Techniken, PCR-Techniken, LCR-Techniken usw.

In einer breit angelegten Studie wurde transkribierter Spacer zwischen 23S- und 5S-rDNA in seiner generellen Nutzbarkeit als diagnostisches Zielmolekül untersucht. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA sehr vieler bakterieller Stämme isoliert, aufgereinigt, in einen Vektor kloniert, sequenziert und schließlich in einem umfangreichen Sequenzvergleich ausgewertet. Überraschenderweise war dieser Sequenzabschnitt durchaus zur Identifizierung fast aller bakteriellen Spezies geeignet. Ermutigt durch diesen Befund wurden die Analysen auf die benachbarten Bereiche des Spacers ausgedehnt. Alles in allem wurden DNA-Fragmente von allen bakteriellen Klassen oder kleineren phylogenetischen Einheiten untersucht. Sie haben eine Ausdehnung von 400-750 Basenpaaren und umfassen das Ende, d.h. speziesabhängig die letzten 330-430 Nukleotide des 23 S rDNA-Gens, den transkribierten Spacer und das komplette 5 S rDNA-Gen. Die Gesamtgröße der Fragmente beträgt 400-750 Basenpaare. Die Experimente zeigten, daß bei fast allen bakteriellen Spezies das 23S rDNA-Gen und das 5 S rDNA-Gen benachbart sind. Diese Erkenntnis ist eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung und Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung.

Die vorliegende Erfindung beruht insbesondere darauf, daß eine DNA-Region zum Nachweis von Mikroorganismen ausgewählt wird, die wesentliche Anteile von mindestens zwei benachbarten Genen beinhalten kann. In der Praxis wird die Nützlichkeit des Bereiches insbesondere durch die phylogenetische Variabilität desselben bestimmt. Je nachdem ob entfernt verwandte Bakterien, bzw. taxonomische Einheiten oder ob Stämme einer Spezies bestimmt werden sollen, kann es diesbezüglich völlig konträre Anforderungen geben. Die Häufigkeit des Vorkommens sowohl variabler, als auch konservierter

Regionen ist nun, wie am Beispiel des 23 S-5 S-Tandems gezeigt, bei zwei Genen größer als bei einem Gen. Das Nutzen von zwei benachbarten Genen, inklusive der variablen interkalierenden Sequenzen stellt also einen beträchtlichen Vorteil dar.

Es wurde ferner gefunden, daß das Ende des 23 S rDNA-Gens, der dazwischenliegende transkribierte Spacer und das 5S rDNA Gen, Nukleotidsequenzen enthalten, die ein vielfältiges Spektrum von sehr variabel bis sehr konserviert abdecken. Eine Feinanalyse dieser Region ergab sehr interessante weitere Aufschlüsse bezüglich des Differenzierungspotentials verschiedener phylogenetischer bakterieller Einheiten (Abb. 2, Tab. 6). Nahezu alle taxonomischen Einheiten sind unter Nutzung von Subbereichen nachzuweisen und/oder zu differenzieren. Dargestellt wurden in Abb. 2 mit den Sektionen 1-9 insbesondere mehr oder weniger variable Bereiche, während die stark konservierten diese interkalieren und diesen benachbart sind. Letztere eignen sich also besonders zum Nachweis hoher taxonomischer Einheiten, wie der gesamten Eubakterien oder von Klassen oder Abteilungen aus diesen.

Einen weiteren Hinweis über die Nutzbarkeit der Region gibt auch der phylogenetische Stammbaum aus Abbildung 1. Es ist zu erkennen, daß die 23 S rDNA-5 S rDNA-Region bezüglich der groben Klassifizierung eine sehr gute Differenzierung ermöglicht, da Mitglieder der Proteobakterien in 1-2 Gruppen angeordnet werden, während die Firmicutes abgetrennt sind. Des weiteren indiziert die Länge der Zweige auch bei nahe verwandten Spezies, daß sie sich gut voneinander unterscheiden lassen. Dabei ist eine phylogenetisch korrekte Zuordnung der eng Verwandten in dem Stammbaum durchaus unerwünscht, denn dann würden sie in einer eng zusammenliegenden kohärenten Gruppe liegen und ließen sich möglicherweise nicht mehr so leicht voneinander unterscheiden.

#### Ausführliche Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum einiger in dieser Arbeit nachgewiesener Bakterien. Es ist zu erkennen, daß die Proteobacteria und die Firmicutes abtrennbare Zweige bilden.

Abb. 2: Schematische Darstellung des hierin beschriebenen ribosomalen Bereiches bestehend aus dem terminalen Bereich der 23 S rDNA, dem transkribierten Spacer und der 5 S rDNA. Dieser Bereich oder Teile davon werden zum Nachweis von Bakterien verwendet. Eine detaillierte Charakterisierung einzelner Domänen ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Abb. 3-7: Nachweis der Enterobakterien durch PCR. Gezeigt sind Ethidiumbromid-gefärbte Gele. Das Vorhandensein von Banden ist charakteristisch für die Anwesenheit von Enterobakterien. In der oberen Hälfte der Abbildungen befinden sich die positiven Nachweise, in der unteren die Negativkontrollen. Die Verwendung der Primer ist in Tabelle 7 zusammengefaßt. Als DNA-Größenstandard wurde eine Mischung von Bgl 1 und Hinf 1 restriktionsverdauter pBR328-Plasmid-DNA (Boehringer Mannheim) verwendet. Die DNA-Leiter umfaßt die Restriktionsfragmentgrößen 154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766 und 2176 Basenpaare.

Abb. 8: Schema einer Konsensus-PCR. Konservierte Primer sind peripher angeordnet, weniger konservierte liegen verschachtelt intern. Die Konsensus-PCR erlaubt zunächst die Amplifikation von DNA mit hoher taxonomischer Breite, im Extremfall aller bakteriellen Spezies. In nachfolgenden Schritten können weitere Amplifikationsrunden stattfinden, eventuell in separaten Reaktionsgefäßen, mit Primern, die für kleinere taxonomische Einheiten spezifisch sind. Im abschließenden Schritt können Sonden verwendet werden, die ebenfalls zur Spezifität des Nachweises beitragen und außerdem die Detektion, z.B. über Farbstoffe unterstützen können. In dieser Abbildung und hierin gilt folgende Nomenklatur: Primer A = die konserviertesten und peripher gelegenen Primer innerhalb des Nachweissystems, Primer [A, B, C....] = Reihenfolge der Primer innerhalb der Verschachtelung wie oben gezeigt, Primer [Großbuchstabe]1 = vorwärts-Primer, Primer [Großbuchstabe]2 = rückwärts-Primer, Primer [Großbuchstabe] [Zahl] [Kleinbuchstabe] = die Kleinbuchstaben kennzeichnen ähnliche Primer oder solche, die an homologen oder vergleichbaren Positionen innerhalb einer Ziel-DNA hybridisieren. Die Sonde liegt bevorzugt im zentralen, hochvariablen Bereich wenn Spezies oder Stämme nachgewiesen werden sollen.

Beispiel 1): Nachweis der Familie der Enterobacteriaceae

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen wurden dann in einer PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz hatte die nachfolgende Zusammensetzung:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
vorwärts-Primer (10 µM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer (10 µM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)* <sup>1</sup>	- 0,3 µl

\*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>3</sup> equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtendkonzentration vorwärts-Primer bzw. rückwärts-Primer von je 10 µM

Die PCR wurde in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation (35 Zyklen)	92 °C	1 min
	62 °C	1 min
	72 °C	30 s
	72 °C	5 min
finale Synthese	72 °C	5 min

Zur Identifikation der Familie der Enterobakterien wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Arten getestet. Die verwendeten Primerkombinationen und primerspezifischen Parameter

sind in Tabelle 7 aufgelistet. Soweit mehr als ein vorwärts- oder rückwärts-Primer in Tabelle 7 angegeben ist, soll das jeweilige Gemisch verwendet werden.

Das Resultat der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid analysiert. Die Anwesenheit von PCR-Produkten ist indikativ für das Vorhandensein von Enterobakterien.

Die synthetisierten PCR-Produkte liegen meist in einer Größenordnung zwischen 400 und 750 Basenpaaren. Dabei können durchaus mehrere Banden auftreten, weil ribosomale Allele bei vielen bakteriellen Spezies heterogen sind. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und zeigen die umfassende Abgrenzung der Enterobakterien von Repräsentanten anderer Taxa.

#### Beispiel 2): Nachweis einer bakteriellen Spezies am Beispiel von *Pantoea dispersa*

Aus Reinkulturen von Bakterien kann in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert werden. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen können in einer PCR eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz kann folglich die nachfolgende Zusammensetzung haben:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
vorwärts-Primer A (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)* <sup>1</sup>	- 0,3 µl

\*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster

\*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>3</sup> equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtkonzentration vorwärts-Primer bzw. rückwärts-Primer von je 10 µM.



Zum Nachweis von *Pantoea dispersa* können die Primerkombinationen SEQ ID 2 + Primer x1, SEQ ID (3-6) + Primer x1 oder die komplementäre Sequenz zu Primer x1 + die komplementäre Sequenz zu SEQ ID 147 verwendet werden. Dabei entspricht Primer x1 dem Nucleotid CGTTGCCCCGCTCGCGCCGCTCAGTCAC. Primer x1 ist eine Partialesequenz aus SEQ ID 108.

Die PCR kann in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt werden:

initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation (35 Zyklen)	92 °C	1 min
	62 °C	1 min
	72 °C	20 s
finale Synthese	72 °C	5 min

Das Resultat der PCR kann mittels Agarose-Gelelektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die synthetisierten PCR-Produkte liegen in einer Größenordnung von 370, 320 und 70 Basenpaaren. Die Abwesenheit von Amplifikaten ist indikativ für die Abwesenheit von genomischer DNA von *Pantoea dispersa*. Mit diesem experimentellen Ansatz lassen sich die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse erzielen.

### Beispiel 3): Verwenden einer Konsensus-PCR in der Chiptechnologie

#### 3a) Prinzip der Konsensus-PCR

In einer Konsensus-PCR, wie schematisch in Abb. 8 gezeigt, werden mindestens zwei sogenannte Konsensus-Primer (A1, A2) verwendet, die in der Lage sind DNA von mindestens zwei taxonomischen Einheiten nachzuweisen. Bei diesen kann es sich um Stämme, Arten oder auch höhere taxonomische Einheiten wie Reiche oder Klassen handeln. In dem Detektionssystem folgt in mindestens einem zweiten Nachweisschritt die Differenzierung der amplifizierten taxonomischen Einheiten mittels einer weiteren PCR und/oder mit Sonden. Die PCR-Primer (B1, B2) des zweiten, bzw. folgenden Amplifi-

kationsschritts werden jeweils so gewählt, daß sie innerhalb des Amplifikationsproduktes liegen und für eine bestimmte taxonomische Einheit ein Nachweispotential haben. Durch Verwendung weiterer Primer (C, D, E....) kann ein Pool vieler taxonomischer Einheiten gegebenenfalls simultan eingeschränkt werden. Außerdem kann in einem Multiplex-Gemisch (z.B. A1a, A1b, A1c, .....) das Nachweispotential auf mehrere taxonomische Einheiten erweitert werden. Letzterer Fall liegt vor, wenn einzelne Nukleotide in einem Primer variieren oder die Primer völlig unterschiedlich sind. Die Nomenklatur der Konsensusprimer ist auch der Legende von Abb. 8 zu entnehmen.

Die Identifizierung von Amplifikationsprodukten kann durch die Primer erfolgen. Ein positiver Nachweis liegt dann vor, wenn die Primer die Ziel-DNA erkennen und erfolgreich amplifizieren. Außerdem können Sonden einen spezifischen Nachweis leisten. Sie hybridisieren spezifisch an die amplifizierte DNA und erlauben durch direkte oder indirekte Koppelung an Farbstoffe den Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz. Alles in allem können Sonden in einer Vielzahl von dem Fachmann bekannten technischen Ausführungen eingesetzt werden. Genannt seien z.B. das Southern Blotting, die Lightcycler-Technologie mit fluoreszierenden Sonden oder die Chiptechnologie, in der beliebig viele Sonden in einem Microarray angeordnet werden.

Besonders vorteilhaft für das Gelingen der Konsensus-PCR ist, daß die Primer in der Reihe A, B, C... zunehmend spezifisch werden. Durch die Auswahl der DNA-Zielregion gemäß Abb. 2 ist dies gewährleistet.

Die Konsensus-PCR hat den Vorteil, daß sie den simultanen Nachweis von mehr als zwei taxonomischen Einheiten aus nur einer Nukleinsäureprobe, die entsprechend klein sein kann, erlaubt. Der Zahl der nachweisbaren Mikroorganismen läßt sich dabei auf verschiedenen Wegen erhöhen. So wächst das Nachweispotential eines Konsensusystems mit der Zahl der Primerspezies A, B, C, ... oder A1a, A1b, A1c, ..., wie sie in Abb. 8 definiert sind. Auch läßt sich ein PCR-Ansatz nach einer ersten Durchführung mit einem Primerpaar A1, A2 trennen und in separaten Ansätzen mit weiteren Primerpaaren B1a + B2a, bzw. B1b + B2b amplifizieren. Schließlich kann die Identität von PCR-Amplifikaten durch Hybridisierung mit Sonden festgestellt werden.

### 3b) Beispiel des Nachweises einer Gruppe von Gattungen der Enterobakterien

Aus Reinkulturen von Bakterien kann in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert werden. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen können in einer PCR eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz kann folglich die nachfolgende Zusammensetzung haben:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
vorwärts-Primer (10 µM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer (10 µM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)* <sup>1</sup>	- 0,3 µl

\*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster

\*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>3</sup> equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtendkonzentration vorwärts-Primer bzw. rückwärts-Primer von 10 µM.

Da in der Chiptechnologie i.d.R. sehr kleine Reaktionsvolumina verwendet werden, kann auch der obige Reaktionsansatz bei konstanten Konzentrationen reduziert werden.

Eventuell ist auch eine Anpassung der PCR-Zykluszeiten erforderlich. Für die Konsensus-PCR kann zunächst ein ribosomales DNA-Fragment amplifiziert werden. Dieser Vorgang kann spezifisch für größere taxonomische Einheiten sein, wie in Beispiel 1 beschrieben, wobei die dort beschriebenen Primer verwendet werden. Alternativ kann ein ribosomales DNA-Fragment von allen Bakterien amplifiziert werden. Ribosomale DNA eines sehr breiten taxonomischen Spektrums von Bakterien bietet z.B. die Verwendung der Primerkombination SEQ ID 211 + SEQ ID 212.

Die amplifizierte DNA wird nach Standardmethoden denaturiert und dadurch in einzelsträngige DNA überführt. Diese Form ist dazu geeignet an eine DNA, RNA oder PNA-Sonde zu binden. Entsprechend der Ausführungsform des Chips wird dann die Hybridisierung des Amplifikats mit der Sonde nachgewiesen. Alternativ kann ein Nachweis mittels eines ELISAs erfolgen. Die Sonde ist so beschaffen, daß sie eine den Anforderungen entsprechende Spezifität aufweist. Dementsprechend können Stämme, Gattungen oder größere taxonomische Einheiten nachgewiesen werden.

Tabelle 3 exemplifiziert den Nachweis einer Gruppe von Gattungen der Familie der Enterobakterien unter der Verwendung der Sonde GTTCCGAGATTGGTT als Teilsequenz von SEQ ID 164. Ein solcher Gruppennachweis ist in der Chiptechnologie besonders sinnvoll, wenn verschiedene Gruppennachweise miteinander überschneiden. In der Schnittmenge kann dann der Nachweis einer einzelnen Art oder von Gruppen von Arten, die z.B. für Lebensmitteluntersuchungen relevant sind, erfolgen.

### 3c) Verwendung der Konsensus-PCR zum Nachweis aller Bakterien

Zum Nachweis aller Bakterien werden in einer ersten Amplifikationsrunde Konsensus-Primer verwendet, die stark konserviert sind. Geeignet zur Sequenzauswahl sind Regionen, die peripher in dem ribosomalen Abschnitt gemäß Abb. 2 liegen. Sie ist demzufolge homolog zu den Bereichen der SEQ ID 1 beginnend bei Position 2571 bzw. endend bei Position 3112. Besonders geeignet aus dieser Region für eine generelle Amplifikation sind z.B. die Primer SEQ ID 211 (z.B. als Primer A1a) und SEQ ID 212 (z.B. als Primer A2a). Außerdem lassen sich leicht weitere Primer (A1b, A1c, .... bzw. A2b, A2c, ....) ableiten, die in einer Multiplex-PCR einen beliebig großen taxonomischen Bereich der Eubacteria erfassen. In dieser Nomenklatur sind die Primer A1 und A2 Primerpaare, B und C..... verschachtelte Primer bzw. A1a und A1b homologe oder ähnliche Primer.

Durch die Verwendung verschachtelter Primer (B, C, D, ....), kann eine erste Differenzierung erfolgen. Dieses kann zudem unterstützt werden, indem der primäre PCR-Ansatz geteilt wird, wobei dann in jedem separaten PCR-Ansatz z.B. ein Primerpaar B, bzw. C bzw. D usw. eingesetzt wird. Diese Verschachtelung ist deshalb besonders vorteilhaft,

weil der ribosomale Bereich gemäß Abb. 8 von außen nach Innen zunehmend variabel ist, wie es auch in Tab. 6 beschrieben ist. Sonden können dann vorzugsweise zur abschließenden Differenzierung und Identifizierung genutzt werden. Wenn z.B. Stämme oder Arten nachgewiesen werden sollen, dann sollte die Sonde zentral in Bereich 7 gemäß Abb. 2 hybridisieren.

In Tabelle 8 werden viele Polynukleotide zum Nachweis von Gattungen und Arten oder Stämmen in einer Konsensus-PCR zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der Primer Nr. 1 aus Tabelle 8 wurde bereits ausführlich in Beispiel 1 beschrieben.

---

Die Polynukleotide folgen in ihren Eigenschaften der Charakterisierung aus Tabelle 6, bzw. Abb. 2. Das bedeutet, daß Primer A1 dem Bereich 1 aus Tabelle 6, bzw. Abb. 2 zugeordnet werden können, Primer A2 dem Bereich 2 ..... , Primer B2 dem Bereich 8 und Primer A2 dem Bereich 9. Entsprechend diesem Konzept können die Primer A1-G1 aus Tabelle 8 als Vorwärtsprimer verwendet werden während die Primer B2 und A2 als Rückwärtsprimer genutzt werden können. Die Sequenzen für die letzteren beiden Primertypen müssen zu diesem Zweck konvertiert werden (Ausnahme Nr. 1 Tabelle 8). Als art- oder gattungsspezifische Sonden lassen sich besonders die "Primer H1" verwenden.

Das hierzu beschriebene Schema einer Konsensus-PCR ist nicht zwingend notwendig für einen erfolgreichen Nachweis. Im Prinzip können die in Tabelle 8 aufgelisteten Polynukleotide in jeder beliebigen Kombination eingesetzt werden. In der Praxis ist zunächst zu klären, welche Bakterien als "unerwünscht" im Nachweis ausgegrenzt werden sollen. Je nach Problemstellung kann dann abweichend von dem gezeigten Schema eine einfachere PCR-Version gewählt werden. Die einfachste Form der Konsensus-PCR besteht dementsprechend aus nur zwei Primern entsprechend den Sequenzen aus Tabelle 8, bzw. komplementären Sequenzen dazu.

Viele der in Tabelle 8 aufgelisteten konservierten Primer haben das Potential die DNA von höheren taxonomischen Einheiten, wie Klassen, Abteilungen oder Familien nachzuweisen. Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist trifft dies insbesondere auf die peripheren Primer A oder homologe Sequenzen von SEQ ID 211 + SEQ ID 212 zu. In Tabelle 8

wird ein breiteres Nachweispotential für eine oder mehrere Gattungen oder Arten insbesondere durch die redundante Aufzählung der Sequenzen angezeigt. Falls nur eine Sequenz für eine Gattung explizit aufgezählt wird, so können zum Nachweis zwei Primer aus dieser Sequenz gewählt werden. Auch ist es möglich allgemeine Primer, z.B. Primer A von verwandten Gattungen, für die betreffende Bakterienklasse zu wählen und aus einer spezifischen Sequenz, z.B. "Primer h1" eine Sonde zu entwerfen. Soweit die Sequenzen sehr lang sind können Nukleotidfragmente von mindestens 15 Basen Länge aus diesen gewählt werden.

### 3d) Ausführung der Konsensus-PCR für die Chiptechnologie

Die konkrete Ausführung der Konsensus-PCR wird im wesentlichen bestimmt durch die erwartete Zahl der nachzuweisenden taxonomischen Einheiten. Da die Konsensus-PCR in ihrer komplexesten Form auch eine Multiplex-PCR darstellt, kann in einem Reaktionsansatz nur eine limitierte Zahl von Bakterien bestimmt werden. Erfahrungsgemäß liegt diese Zahl unter 20. Aus diesem Grunde kann es vorteilhaft sein verschiedene PCR-Ansätze mit der gleichen Probe und unterschiedlichen Primern A, B etc. (Nomenklatur nach Abb. 8) durchzuführen.

Aus natürlichen Proben werden Bakterien zunächst angereichert oder mit an sich bekannten Standardverfahren wird genomische DNA direkt aus ihnen isoliert. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen können in einer PCR eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz kann folglich die nachfolgende Zusammensetzung haben:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
forwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)* <sup>1</sup>	- 0,30 µl

- \*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster
- \*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten
- \*<sup>3</sup> equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtkonzentration der Primer 10  $\mu$ M. Primer können z.B. entworfen und kombiniert werden wie unter 3c beschrieben.

Da in der Chiptechnologie i.d.R. sehr kleine Reaktionsvolumina verwendet werden, kann auch der obige Reaktionsansatz bei konstanten Konzentrationen reduziert werden. Eventuell ist auch eine Anpassung der PCR-Zykluszeiten erforderlich.

Nach den Amplifikationsrunden wird die DNA vereinigt. Auf einem Chip werden Sonden, in einer spezifischen Ausführungsform aus den Sequenzen der Spalte "Primer H1" der Tabelle 8 ausgewählt werden können, immobilisiert. Technische Verfahren hierzu sind dem Fachmann bekannt. Die vereinigte DNA wird 1:1 mit Denaturierungspuffer (Bsp. 4) verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das zehnfache Volumen Hybridisierungspuffer (Bsp. 4) dazugegeben und die Lösung langsam bei 37-60° C über den Chip, das heißt die mit Sonden behaftete Oberfläche, geleitet. Die so behandelte Chipoberfläche wird anschließend mit Waschpuffer (Bsp. 4) mindestens 2 min bei 37-60° C dreimal gewaschen. Abschließend kann die Detektion erfolgen. Hierzu können Primer verwendet werden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die Fluoreszenz kann dann mit einem Detektor, z.B. einer CCD-Kamera wahrgenommen werden. Es gibt jedoch viele verschiedene alternative Detektionsmöglichkeiten. So ist es z.B. auch möglich die Bindung der einzelsträngigen Amplifikationsprodukte an die Sonden durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR) zu verfolgen und zu quantifizieren. Letztere Methode hat den Vorteil, daß keine Farbstoffe zur Detektion verwendet werden müssen. Bei Nutzung der SPR sollte selbige so ausgelegt sein, daß die Detektion simultan auf den Bereichen der Oberfläche erfolgt, die die gleichen Sonden besitzen. Eine besonders vorteilhafte Ausführung liegt dann vor, wenn viele, d.h. mehr als 100 oder 1000 separate Detektionsflächen auf dem Chip angeordnet sind. Ein Ansteigen des SPR-Signals, verursacht durch die Nukleinsäure-Hybridisierung auf diesen

Flächen, stellt ein positives Ergebnis dar. Auf diese Weise lassen sich mit den in Tabelle 8 aufgelisteten Primern die dazugehörigen Bakterien, oder im Prinzip alle Bakterien nachweisen und gegebenenfalls quantifizieren.

#### Beispiel 4) Nachweis von Mikroorganismen mit Sonden

Sonden sind als Polynukleotide, d.h. als DNA, RNA, PNA oder in einer ähnlichen Ausführungsform, die dem Fachmann geläufig ist, grundsätzlich geeignet die Konzentrierung und den Nachweis von DNA oder RNA zu leisten. Sie liegen als einzelsträngige Moleküle vor oder werden durch Denaturieren, was z.B. durch Erhitzen oder mit Natronlauge entsprechend publizierten Standardprotokollen erreicht werden kann, in diese Form überführt.

Zum Nachweis von Mikroorganismen muß die DNA oder RNA derselben aus diesen isoliert und eventuell gereinigt werden. Eine hohe Effizienz der Nukleinsäureausbeute kann durch verschiedene Maßnahmen erreicht werden:

- 1) die Mikroorganismen können mit physikalischen Methoden, z.B. mit an magnetischen Partikeln gekoppelten Antikörpern oder durch Zentrifugieren ankonzentriert werden;
- 2) die DNA oder RNA der Mikroorganismen kann in einer PCR oder vergleichbaren Amplifikationsreaktion amplifiziert werden;
- 3) die eventuell amplifizierte DNA oder RNA der Mikroorganismen wird im Verlaufe der Reinigung mit kommerziell erhältlichem Material beim Aufreinigen ankonzentriert.

Die Verbesserung der Effizienz der Nukleinsäureausbeute, insbesondere durch Amplifikation, kann selbst bedeutend zur Spezifität des Nachweises der Bakterien beitragen.

Es folgt anschließend ein Inkubationsschritt, in welchem die Sonden mit den nachzuweisenden Nukleinsäuren (sofern die nachzuweisenden Mikroorganismen vorhanden waren)



ein Hybridmolekül bilden. Die Bildung des Hybridmoleküls erfolgt unter kontrollierten Bedingungen. Ebenso folgen Waschschrte mit Puffern unter Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Ionenkonzentration), die die spezifische Hybridisierung von Nukleinsäuren erlauben, während weniger spezifische und unerwünschte Hybridmoleküle dissoziieren.

Abschließend erfolgt die Detektion von Hybridmolekülen. Zur Detektion gibt es eine Vielzahl von Ausführungsformen, die dem Fachmann im Einzelnen bekannt sind. Zum Einsatz kommen Farbstoffe, eventuell fluoreszierende, die direkt oder indirekt an die Sonden oder die nachzuweisende DNA gekoppelt werden oder in diese inkorporiert werden. Dieses kann insbesondere auch in der Chiptechnologie oder der Lightcyclertechnologie der Fall sein. Darüber hinaus gibt es andere physikalische Verfahren, wie z.B. verstärkte Totalreflektion des Lichts (attenuated total reflection) an Grenzoberflächen mit zwei unterschiedlichen Dichten, die zur Anwendung bei der Detektion der Hybridmoleküle kommen können.

Die Auswertung der Detektion kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In einem "alles oder nichts"-Nachweis kann das Hybridmolekül nur nachgewiesen werden, wenn die gesuchten Mikroorganismen vorhanden waren. Wenn also die zuvor erwähnte Amplifikationsreaktion mit den Nukleinsäuren der Mikroorganismen zu keiner Vermehrung der Nukleinsäuren geführt hat, dann werden auch keine Hybridmoleküle nachweisbar sein. Wurden jedoch "unerwünschte" Nukleinsäuren amplifiziert oder waren diese in großer Menge vorhanden, dann kann durch die Stringenzbedingungen bei der Hybridisierung ein Ausschluß dieser Nukleinsäuren erfolgen. Außerdem ermöglicht die Quantifizierung der Hybridmoleküle eine Feinabstimmung der Spezifität des Nachweises, indem ein Grenzwert für den positiven Nachweis festgelegt wird.

- Alle in diesem Patent spezifizierten Nukleinsäuren sind grundsätzlich als Sonde verwendbar. Ein Extrakt möglicher Sonden ist insbesondere in Tabelle 3 aufgelistet. Die Nukleinsäuren leisten den Nachweis der in der Tabelle genannten Gattungen und die Abgrenzung gegen alle anderen Gattungen der Eubakterien.

Nachfolgend sei exemplifiziert wie die hierzu spezifizierten DNA-Bereiche als Sonden zum Nachweis von Mikroorganismen eingesetzt werden können. In diesem Beispiel wird ein ELISA-Verfahren zur Detektion verwendet. Dabei werden Nukleinsäuren mittels einer enzymatischen Farbreaktion, die in Mikrotiterplatten abläuft, nachgewiesen.

Im vorliegenden Beispiel wird die DNA zunächst in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dabei werden Primer verwendet, die mit Digoxigenin gekoppelt sind. Anschließend wird eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte mit einer biotinmarkierten Sonde beladen, so daß es zu einer Kopplung der Sonden an die Plattenoberfläche kommt. Die alkalisch denaturierten PCR-Amplifikate hybridisieren in einer 30-minütigen Reaktion mit den Sonden. Das 5'-Digoxigenin markierte Ende der Amplifikate dient nun als Antigen für einen spezifischen Antikörper, welcher wiederum an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe von Tetramethylbenzidin kommt es zur Bildung eines blauen Farbstoffes. Die Entstehung dieses Farbstoffes wird mit 0,5 molarer Schwefelsäure gestoppt. Gleichzeitig schlägt die Farbe aufgrund der Verschiebung des pH-Wertes nach gelb um. Die Intensität der Absorption wird im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Zur Durchführung des ELISA werden die nachfolgenden Reagenzien angesetzt:

– Hybridisierungspuffer (2,5x SSC)

2,5 x SSC	62,5 ml von 20 x SSC (s. unten)
2 x Denhardts	20 ml von 50 x Denhardts (s. unten)
10 mM Tris (Gibco, Nr. 15504-038)	5 ml von 1 M Tris
1 mM EDTA (Fluka, Nr. 03699)	1 ml von 0,5 M EDTA
mit bidest. Wasser auf 0,5 l auffüllen und pH 7,5 einstellen	

– Waschpuffer 1

1 x SSC	50 ml von 20 x SSC (s. unten)
2 x Denhardts	40 ml von 50 x Denhardts (s. unten)
10 mM Tris (Gibco, Nr. 15504-038)	10 ml von 1 M Tris
1 mM EDTA (Fluka, Nr. 03699)	2 ml von 0,5 M EDTA
mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen und pH 7,5 einstellen	

## – Waschpuffer 2

100 mM Tris (Gibco, Nr. 15504-038)	12,15 g
150 mM NaCl (Merck, Nr. 6404.5000)	8,78 g
0,05% Tween 20 (Serva, Nr. 37470)	0,5 g
0,5% Blocking Reagenz (Boehringer) 5g in D1 (s. unten) bei 60°C lösen	
10 µg/ml Heringsperma	10 ml von der Stammlösung mit 10mg/ml
mit bidest. Wasser auf 1l auffüllen und pH 7,5 einstellen	

## – Denaturierungspuffer

125 mM NaOH (Fluka, Nr. 71690)	0,5 g
20 mM EDTA (Fluka, Nr. 03699)	0,745 g
mit bidest. Wasser auf 0,1 l auffüllen	

## – Kopplungspuffer

10 mM Tris (Gibco, Nr. 15504-038)	10 ml von 1 M Tris
1 mM EDTA (Fluka, Nr. 03699)	2 ml von 0,5 M EDTA
100 mM NaCl (Merck, Nr. 6404.5000)	5,88 g
0,15% Triton X 100 (Chemikalienlager)	15 ml
mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen und pH 7,5 einstellen	

– Stoppreagenz (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

95%ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14 ml
mit bidest. Wasser auf 0,5 l auffüllen	

## – 50 x Denhardts

Ficoll 400 (Pharmacia Biotech, Nr. 17-0400-01)	5 g
Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Nr. P-2307)	5 g
Rinder-Serumalbumin	5 g
mit bidest. Wasser auf 0,5l auffüllen	

## – 20 x SSC

NaCl (Merck, Nr. 106404.1000)	350,36 g
-------------------------------	----------

Natriumcitrat (Trinatriumcitratdihydrat, Fluka, Nr. 71404)	176,29 g
--	----------

mit bidest. Wasser auf 2 l auffüllen und pH 7,0 einstellen

## – D 1

100 mM Maleinsäure (Fluka, Nr. 63190)	11,62 g
---------------------------------------	---------

150 mM NaCl (Merck, Nr. 106404.1000)	8,76 g
--------------------------------------	--------

NaOH (Fluka, Nr. 71690)	ca. 7,5 g
-------------------------	-----------

mit bidest. Wasser auf 2 l auffüllen und pH 7,0 einstellen

**Durchführung des ELISA:**

Pro Kavität werden 200 µl Bindungspuffer und 1 µl Sonde aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Klebefolie abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die zu untersuchenden PCR-Amplifikate werden bei Raumtemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:1 mit Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 10 ml dieser Probe in die zwischenzeitlich entleerten Kavitäten gefüllt. Zusätzlich werden in jede Kavität je 100 µl Hybridisierungspuffer gegeben und 30 min bei 37-60° C inkubiert. Zum Waschen werden die Kavitäten entleert und mit 200 ml Waschpuffer 1, der auf 37-60° C vorgeheizt wurde, gefüllt und 2 min bei der gleichen Temperatur inkubiert. Dieser Waschschrift wird dreimal durchgeführt.

Nachdem der Waschpuffer sorgfältig entfernt wurde, wird der Anti-Dig-POD-Antikörper (DAKO) 1:3000 verdünnt (1 ml in 3 ml Waschpuffer 2) und jeweils 100 ml dieser Lösung in die trockenen Kavitäten gefüllt. Diese Anordnung wird bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wird die Mikrotiterplatte dreimal mit 200 ml Waschpuffer 2 je Vertiefung gewaschen. Pro Kavität werden nun 100 ml des Farbstoffs BM blue (Boehringer) hinzu-

gegeben. Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 100 ml 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Extinktion der Proben wird im ELISA-Reader quantifiziert.

In dem oben beschriebenen Verfahren lassen sich die in Tabelle 4 zusammengefaßten Sonden zum Nachweis der aufgeführten Arten verwenden.

Beispiel 5): Allgemeine Nutzbarkeit der in diesem Patent spezifizierten DNA-Regionen zum Nachweis von Bakterien

Die hierin spezifizierten ribosomalen DNA-Regionen, insbesondere wenn sie mit dem 23S-5S ribosomalen Spacer kombiniert werden, sind geeignet Eubakterien nachzuweisen. Der Fachmann ist in der Lage sehr schnell mit Hilfe der Sequenzen unter SEQ ID 1-530 oder unter Fokussierung auf die genannte ribosomale DNA-Region bakterielle taxonomische Einheiten seiner Wahl schnell zu identifizieren. Nachfolgend ist ein möglicher Weg exemplifiziert, der die generelle Nutzbarkeit der vorliegenden Erfindung für alle eubakteriellen Spezies eröffnet.

Der hier beschriebene Weg umfaßt im wesentlichen 3 Schritte. Im ersten wird eine ribosomale Region, ungefähr umfassend die letzten 330-430 Nukleotide des 23S-Gens, der nachfolgend transkribierten Spacer und das ribosomale 5S-Gen amplifiziert. Da diese Region bei den verschiedenen eubakteriellen Spezies längenvariabel ist, hat sie eine Ausdehnung von insgesamt 400 bis ca. 750 Nukleotiden. Soweit die DNA-Sequenz noch nicht bekannt ist, kann es vorteilhaft sein, diese für die nachzuweisende und einige nahe verwandte abzugrenzende Spezies zu bestimmen. Aus einem Sequenzvergleich kann der Fachmann leicht die besten Oligonukleotide bestimmen, die den gewünschten Nachweis, z.B. als PCR-Primer oder Sonde leisten. Im vorliegenden Beispiel werden auf diese Weise sowohl Primer als auch Sonden ausgewählt. Alternativ können auch die hierin genannten Sequenzen direkt für ein breites Spektrum von Bakterien genutzt werden, insbesondere wenn die Stringenzbedingungen der PCR und/oder der Hybridisierung geeignet gewählt werden.

### A) Amplifikation ribosomaler DNA

Der zu verwendende DNA-Abschnitt läßt sich aus genomischer bakterieller DNA der Proteobakterien und vieler anderer bakterieller Klassen mit den Primern SEQ ID 211 und 212 amplifizieren. Sollte es bei der Amplifikation von DNA anderer Klassen Probleme geben, so werden Primer, die aus DNA-Regionen, welche der SEQ ID 211 und 212 entsprechen, abgeleitet sind, zum Erfolg führen.

Aus Reinkulturen der in Tabelle 5 aufgeführten Bakterien wird in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen wird dann in eine PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz hat die nachfolgende Zusammensetzung:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
vorwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)* <sup>1</sup>	- 0,3 µl

\*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>3</sup> equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtkonzentration vorwärts-Primer bzw. rückwärts-Primer von je 10 µM

Die PCR wird in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:

initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation (35 Zyklen)	92 °C	1 min
	52 °C	1 min
	72 °C	30 s
finale Synthese	72 °C	5 min

Genomische DNA, die zur Amplifikation verwendet werden kann, ist in Tabelle 5 beispielhaft aufgelistet.

**B) Gattungs- und speziesspezifische Amplifikation eines Unterbereichs des Produkts von A)**

Das unter A) amplifizierte DNA-Produkt kann direkt zum Nachweis von Bakterien, insbesondere unter Verwendung spezifischer Sonden, genutzt werden. Es kann vorteilhaft sein, einen Teilbereich dieser Sequenz primär zu amplifizieren, wenn durch diesen Vorgang eine Beschränkung auf eine kleinere systematische Einheit der Bakterien, wie Arten, Gattungen oder Familien erreicht werden soll. Zumindest ein Teil der Differenzierungsleistung kann dann bereits durch die Amplifikationsprimer erbracht werden. Der unter A) amplifizierte Bereich bietet eine Vielzahl von Subregionen, die spezifische Differenzierungsleistungen erbringen. Der Fachmann wird leicht diese Regionen durch einen Vergleich der Sequenzen von zu identifizierenden Bakterien mit nahe verwandten Bakterien erkennen.

Im vorliegenden Beispiel wurden als Regionen für spezifische Primer der Beginn des 23S-5S transkribierten Spacers und das Ende desselben ausgewählt. Die konkreten Sequenzen und die Herkunft der Primer ist in Tabelle 5 zusammengefaßt. Aus einem Vergleich der Sequenzen ist zu erkennen, daß sie im wesentlichen einen speziesspezifischen Nachweis leisten. Eine Ausnahme bilden die Primer für die *Vibrio*-Spezies, die auch schon einen gattungsspezifischen Nachweis erlauben. In den vorwärts-Primern ist insbesondere für Enterobakterien die Sequenz CGAAG...TTTT und in den rückwärts-Primern die Sequenz AACAGAATTT konserviert. Es gibt nun zwei Möglichkeiten die Spezifität

der Primer auf Gattungen und Gruppen von Gattungen, z.B. aus den Enterobakterien, zu erweitern: erstens können die Annealingtemperaturen der PCR erniedrigt werden. Zweitens können die Sequenzen der vorwärts-Primer in Richtung 23S-Gen und der rückwärts-Primer in Richtung 5S-Gen verschoben werden. Das Resultat sind Primer, deren Sequenzen weniger speziesspezifisch sind. Die konkrete Ausführung kann dabei an die Anforderungen des Nachweises ausgerichtet werden. Hier sei der speziesspezifische Nachweis mit den Primern der Tabelle 5 durch PCR-Amplifikation exemplifiziert.

Aus Reinkulturen der in Tabelle 5 aufgeführten Bakterien wird in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Je ca. 1 bis 100 ng dieser Präparationen wird dann in eine PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz hat die nachfolgende Zusammensetzung:

genomische DNA	- 1 µl
H <sub>2</sub> O	- 19,8 µl
Puffer (10x) * <sup>1</sup>	- 2,5 µl
dNTP (10 mM)* <sup>2</sup>	- 0,25 µl
vorwärts-Primer (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
rückwärts-Primer* (10 mM)* <sup>3</sup>	- 0,20 µl
MgCl <sub>2</sub>	- 0,75 µl
Taq-Polymerase (5 U/ml)* <sup>1</sup>	- 0,3 µl

\*<sup>1</sup> Puffer und Enzym von Biomaster oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>2</sup> Nukleotide von Boehringer Mannheim oder einem beliebigen anderen Lieferanten

\*<sup>3</sup> vorwärts-Primer A und rückwärts-Primer\* sind in Tabelle 5 aufgelistet, equimolare Mengen von Primern, falls Gemische in einer Gesamtendkonzentration der Primer von je 10 µM; rückwärts-Primer\* weisen die komplementäre Sequenz zu rückwärts-Primern nach Tabelle 5 auf

Die PCR wird in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler mit dem nachfolgend aufgeführten Thermoprofil durchgeführt:



initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation (35 Zyklen)	92 °C	1 min
	* 45-72 °C	1 min
	72 °C	30 s
finale Synthese	72 °C	5 min

\* Die Annealingtemperatur kann nach den allgemein verwendeten Formeln für PCR-Primer bestimmt werden.

Das Ergebnis der Amplifikation ist in Tabelle 5 aufgelistet, d.h. der speziesspezifische Nachweis von Bakterien unter Verwendung der Primer der Tabelle 5 führt zur Identifikation der den Primern in dieser Tabelle zugeordneten Bakterien. Die Verwendung von allgemeineren Primern hingegen, deren Entwurf zuvor beschrieben wurde, kann zum Nachweis aller enterobakteriellen Gattungen oder oder zum Nachweis aller Gattungen des  $\gamma$ -Zweiges der Proteobakterien führen.

C) Weitere Spezifizierung des Nachweises durch Verwendung von Primern oder Sonden aus dem 23S-5S ribosomalen Spacer

Soweit nach den Schritten A) und/oder B) eine Amplifikation von DNA höherer taxonomischer Einheiten erfolgte kann anschließend durch die Auswahl von Sonden eine weitere Differenzierung des Nachweises erfolgen. Zum artspezifischen Nachweis kann ein variabler DNA-Bereich, z.B. ein zentraler Bereich des 23S-5S transkribierten Spacers verwendet werden. Die Sonden können dabei z.B. in einen Chip integriert sein oder im Rahmen der Lightcyclertechnologie oder in einem ELISA verwendet werden. In letzterem Fall kann das ELISA-Protokoll von Beispiel 4 Anwendung finden. Die Resultate des speziesspezifischen Nachweises von Bakterien entsprechen dabei der Auswahl des 23S-5S transkribierten Spacers, da dieser zum Großteil speziesspezifische Sequenzbereiche aufweist. Bei Verwendung der Primer aus Tabelle 5 und Nutzung der entsprechenden Spacer (Spalte SEQ ID aus Tabelle 5) ist somit die Identifikation der in dieser Tabelle aufgelisteten Arten zu erreichen.

### Erläuterungen verwendeter Begriffe:

#### Ableiten von DNA-Sequenzen:

Um ein Poly- oder Oligonukleotid, das zum Nachweis von taxonomischen Einheiten verwendet werden soll, zu finden und zu entwickeln, kann es von einer oder mehreren DNA-Sequenzen abgeleitet werden. Im Fall vom mehreren Sequenzen ist dabei ein Alignment der Sequenzen, also ein Vergleich, vorteilhaft. Abgeleitete Oligonukleotide können zur ursprünglichen Sequenz identisch sein. Sie können außerdem einen Konsensus aus einer Menge von Variablen darstellen. In diesem Fall werden die Nukleotide des Polymers entsprechend den häufigsten oder vorherrschenden Bausteinen an einer bestimmten Position der analysierten Sequenzen ausgewählt. Außerdem ist es möglich in einer zu entwickelnden Sequenz Variablen gemäß der Definition "Nukleotide" zu wählen. Die aus diesen variablen Sequenzen resultierenden DNA- oder RNA-Polymere stellen folglich ein Gemisch von Molekülen dar, das an den Positionen der Variablen alle erlaubten Nukleotide aufweist.

#### Analoge DNA-Sequenzen:

Analoge DNA-Bereiche haben die gleiche Funktion oder eine ähnliche Lokalisation wie eine vorgegebene Sequenz, sind jedoch nicht auf den gleichen phylogenetischen Ursprung zurückzuführen. Ein Beispiel ist gegeben mit dem transkribierten Spacer zwischen 5 S rDNA und 23 S rDNA, wenn er keine Ähnlichkeit mit einem zu vergleichenden transkribierten Spacer gleicher Lokalisation aufweist. Das ist möglich, weil er bei entfernt verwandten Organismen häufig so variabel ist, daß eine stammesgeschichtliche Abstammung oder Homologie nicht mehr feststellbar ist. Der obige transkribierte Spacer ist jedoch als DNA-Sequenz und in seiner Funktion als transkribierter Spacer oder in seiner Lokalisation eindeutig definierbar, da er am Ende des kodierenden Bereiches der 23 S rDNA beginnt und am Anfang der 5 S rDNA endet.

### Benachbarte Gene:

Gene sind benachbart, wenn sie durch kein anderes Gen getrennt sind oder wenn dieses bei zwei bestimmten Genen für den größten Teil der untersuchten Spezies zutrifft. Eine Trennung liegt nur dann vor, wenn ein weiteres Gen zwischen zwei anderen Genen liegt.

### Enterobakterien

Die Enterobakterien sind eine Familie des  $\gamma$ -Zweiges der Proteobacteria. Der Begriff involviert alle taxonomischen Einheiten der Familie, insbesondere die Gattungen *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Brenneria*, *Budvicia*, *Cedecea*, *Calymmatobacterium*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Moellerella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Phlomobacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*.

### Eubakterien

Die Eubakterien bilden neben den Archaeobakterien ein Reich der Prokaryonten. Hierzu wurden "Bakterien" oder "Eubakterien" synonym verwendet. Mit dem Begriff sind alle taxonomischen Einheiten innerhalb dieses Reiches gemeint. Zu den Eubakterien gehören z.B. die *Aquificales*, *Aquificaceae*, *Desulfurobacterium*-Gruppe, *Chlamydiales*, *Verrumicrobia*-Gruppe, *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Verrumicrobia*, *Verrumicrobiales*, *Coprothermobacter*-Gruppe, *Cyanobacteria*, *Chroococcales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, *Prochlorophytes*, *Stigonematales*, *Cytophagales*, Gruppe der grünen Schwefelbakterien, *Bacteroidaceae*, *Cytophagaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Flexibacter*-Gruppe, *Hymenobacter*-Gruppe, *Rhodothermus*-Gruppe, *Saprospira*-Gruppe, *Sphingobacteriaceae*, *Succinovibrionaceae*, Grüne Schwefelbakterien, *Fibrobacter*, *Acidobacterium*-Gruppe, *Fibrobacter*-Gruppe, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidomicrobidae*, *Actinobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Rubrobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Bacillus*-Gruppe, *Clostridium*-Gruppe, *Lactobacillus*-Gruppe, *Streptococcus*-Gruppe, *Clostridiaceae*, *Haloanaerobiales*, *Heliobacterium*-Gruppe, *Mollicutes*, *Sporomusa*-Zweig, *Syntrophomonas*-Gruppe, *Thermoanaerobacter*-Gruppe, *Flexistipes*-Gruppe, *Fusobacteria*, Grüne Nicht-Schwefelbakterien, *Chloroflexaceae*-Gruppe, *Chloroflexaceae*, photosyn-

thetische Flexibakterien, Holophaga-Gruppe, Nitrospira-Gruppe, Planctomycetales, Planctomycetaceae, Proteobacteria, Purpur-Nichtschwefelbakterien, Alpha-Unterabteilung der Proteobakterien, Beta-Unterabteilung der Proteobakterien, Gamma-Unterabteilung der Proteobakterien, Delta/Epsilon-Unterabteilung der Proteobakterien, Spirochetales, Leptospiraceae, Spirochaetaceae, Synergistes-Gruppe, Thermodesulfobacterium-Gruppe, Thermotogales, Thermus-Gruppe oder Deinococcus-Gruppe.

#### Gen:

Das Gen umfaßt den offenen Leserahmen oder kodierenden Bereich einer DNA. Es kodiert somit ausschließlich für ein Protein. Auch das Cistron ist ein Gen, das zusammen mit anderen Cistrons jedoch auf einer mRNA liegt. DNA-Regionen, die die Transkription des Gens regulieren, wie der Promotor, Terminator, Enhancer gehören ebenfalls zum Gen. Wenn in diesem Patent vereinfachend vom 23 S rDNA-Gen und 5 S rDNA-Gen die Rede ist, so geschieht dies in Anlehnung an übliche Bezeichnungen. Gemäß unserer Definition sei das 23S-rDNA-Gen oder das 5S-rDNA-Gen jedoch kein Gen, sondern ein eigenständiger funktioneller DNA-Abschnitt, da er nicht für ein Protein kodiert und nicht in Codons unterteilt werden kann.

#### Transkribierter Spacer:

Der hierin schwerpunktmäßig behandelte transkribierte Spacer liegt hinter dem kodierenden Bereich des 23 S rDNA-Gens und vor dem kodierenden Bereich des 5 S rDNA-Gens. In seiner systematischen Einordnung nimmt er eine Sonderstellung ein. Da er transkribiert wird, also Bestandteil der mRNA und eines biologisch inaktiven Vorläufermoleküls, der prae-rRNA, ist, gehört er nicht zum intergenischen Bereich. Das Vorläufermolekül wird durch Ausschneiden des transkribierten Spacer in ein im ribosomalen Kontext biologisch aktives Molekül verwandelt. Andererseits läßt er sich funktionell oder phylogenetisch auch nicht eindeutig dem 23 S-Gen oder 5 S-Gen zuordnen. Da der Genbegriff in diesem Fall zur Klassifizierung offensichtlich nicht herangezogen werden kann, sei der "transkribierte Spacer" der ribosomalen Operons gleichberechtigt zu dem "Gen" und der "intergenischen Region" eine eigenständige funktionelle DNA-(RNA-) Klasse.

### Homologe DNA-Sequenzen

DNA oder RNA-Sequenzen sind dann homolog, wenn sie den gleichen phylogenetischen Ursprung haben. Das kann daran zu erkennen sein, daß mindestens 40 % der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt identisch sind. In einem größeren DNA-Abschnitt können variable Abschnitte vorliegen. In dem Fall ist es ausreichend, wenn die phylogenetische Verwandtschaft angezeigt wird durch das Vorhandensein einer 25 Nukleotide langen Sequenz, die mindestens zu 60 % identisch ist mit einer anderen 25 Nukleotide langen Sequenz der zu vergleichenden DNA. Außerdem können homologe Sequenzen häufig am besten erkannt werden, wenn ein Vergleich mit nahe Verwandten Organismen erfolgt. Zum Erkennen der Homologie von Sequenzen fern verwandter Organismen ist dann ein sequentieller Vergleich mit Sequenzen von Arten erforderlich, die den Abstand zu den fern verwandten phylogenetisch überbrücken.

### Identische DNA-Sequenzen / Prozent Identität

Zur Bestimmung der Identität (im Sinne von vollständiger Übereinstimmung, entsprechend 100 % Identität) von DNA oder RNA-Sequenzen werden Teilsequenzen eines größeren Polynukleotids betrachtet. Diese Teilsequenzen umfassen 10 Nukleotide und sind dann identisch, wenn alle 10 Bausteine bei zwei Vergleichssequenzen identisch sind. Die Nukleotide Thymidin und Uridin seien identisch. Als Teilsequenzen können alle möglichen Fragmente eines größeren Polynukleotids betrachtet werden.

Dabei liegt 90 % Identität vor, wenn in den beiden zu vergleichenden Sequenzen in einem Abschnitt 9 von 10 Nukleotide bzw. 18 von 20 Nukleotide identisch sind.

Als Beispiel seien zwei Polynukleotide betrachtet, die 20 Nukleotide umfassen und sich in dem 5. Baustein unterscheiden. In einem Sequenzvergleich findet man dann sechs 10-er Nukleotide, die identisch sind und 5, die nicht identisch sind, da sie sich in einem Baustein unterscheiden.

Außerdem kann die Identität graduell bestimmt werden, wobei die Einheit in Prozent angegeben wird. Zur Bestimmung des Grades der Identität werden auch Teilsequenzen be-

trachtet, die minimal die Länge der tatsächlich genutzten Sequenz, z.B. als Primer, oder aber 20 Nukleotide umfassen.

Als Beispiel werden Polynukleotide A mit einer Länge von 100 Nukleotiden und B mit einer Länge von 200 Nukleotiden verglichen. Aus Polynukleotid B wird ein Primer abgeleitet mit einer Länge von 14 Nukleotiden. Zur Bestimmung des Grades der Identität wird Polynukleotid A mit dem Primer in seiner ganzen Länge verglichen. Wenn die Sequenz des Primers in Polynukleotid A vorkommt, wobei sie aber in einem Baustein abweicht, dann gibt es ein Fragment mit einem Identitätsgrad von 13:14  $\rightarrow$  92,3 %.

Im zweiten Beispiel werden die zuvor genannten Polynukleotide A und B in ihrer Gesamtheit verglichen. In diesem Fall werden alle möglichen Vergleichsfenster einer Länge von 20 Nukleotiden angelegt und für sie der Identitätsgrad bestimmt. Sind also Nukleotid Nr. 50-69 von Polynukleotid A und B mit Ausnahme von Nukleotid Nr. 55 identisch, dann ergibt sich für diese Fragmente ein Identitätsgrad von 19:20  $\rightarrow$  95 %.

#### Konservierte und variable Primer

Konservierte Primer sind Nukleotide die an konservierte DNA- oder RNA-Regionen hybridisieren. Der Begriff konserviert charakterisiert die evolutionäre Veränderlichkeit einer Nukleotidsequenz für Spezies verschiedener taxonomischer Einheiten. Er ist deshalb ein vergleichendes Maß. Je nachdem welche Sequenz zum Vergleich herangezogen werden kann ein Bereich bzw. Primer konserviert oder variabel sein. Die Charakterisierung des Primers als "konserviert" oder "variabel" erfolgt anhand unmittelbar angrenzender oder überlappender Regionen bezüglich des Hybridisierungsziels, die die gleiche Länge haben wie der Primer. Es können also Vergleichssequenzen vom gleichen Organismus oder homologe oder ähnliche Sequenzen von anderen Organismen gewählt werden. Beim Vergleich zweier Sequenzen ist eine konserviert, wenn sie mit der Vergleichssequenz zu mindestens 95% identisch ist und variabel, wenn sie zu weniger als 95 % identisch ist.

### Verschachtelte Primer

Verschachtelte Primer werden insbesondere in der Konsensus-PCR verwendet. Es handelt sich dabei um Primer, die ein Fragment eines bereits amplifizierten Polynukleotids amplifizieren. Verschachtelte Primer hybridisieren also mit einem Bereich innerhalb eines bereits vermehrten DNA- oder RNA-Zielmoleküls. Die Amplifikation mit verschachtelten Primern kann dabei beliebig häufig geschehen, so daß sukzessive kleinere Amplifikationsprodukte entstehen.

### Hybridisierung von DNA oder RNA

Zwei identische oder ähnliche Nukleotidfragmente können miteinander zu einem Doppelstrang hybridisieren. Eine solche Hybridisierung kann nicht nur stattfinden zwischen DNA-, RNA- oder PNA-Einzelsträngen, sondern es können auch Hybridmoleküle zwischen DNA und RNA, DNA und PNA, RNA und PNA usw. gebildet werden. Es gibt eine Reihe von Faktoren, die bestimmen ob zwei Polynukletide hybridisieren. Eine Hybridisierung kann stattfinden in einem Temperaturrahmen von bevorzugt bei 37-60°C. Außerdem kann eine Hybridisierung unter diskreten Hybridisierungs- und Waschschritten ablaufen. Experimentelle Parameter zur Spezifizierung der Hybridisierungsbedingungen sind in Beispiel 4) gegeben. Dabei ist eine spezifische Hybridisierung dann gegeben, wenn mit der eingesetzten Sonde nur eine Hybridisierung mit der gewünschten Zielsequenz erfolgt und nicht mit einer anderen DNA, die ebenfalls in der Probe vorliegt.

### Kombinationen in der Nutzung von Nukleotiden

Primer, Sonden, DNA-Fragmente, Unterbereiche von Polynukleotiden oder Oligonukleotiden können in vielen Kombinationen genutzt werden. Möglich sind z.B. die beliebige Kombination zweier Primer aus einer Gruppe von Primern, die beliebige Auswahl einer Sonde aus einer Gruppe von Sequenzen und die Auswahl von Primern aus der gleichen Gruppe von Sequenzen. In letzterem Fall können die Primer und Sonde(n) identisch oder verschieden sein. Primer oder Sonden können auch aus zwei oder mehreren DNA-Fragmenten zusammengesetzt sein, wobei alle möglichen Variationen der Zusammensetzung in Betracht kommen. Kombinationen sind auch möglich in der Abfolge von distinkten PCR-Schritten mit verschiedenen Primern und dem Einsatz von Sonden.

### Konsensus PCR

Eine Konsensus-PCR wird mit Konsensusprimern durchgeführt. Diese sind in der Lage die DNA von mindestens 2 taxonomischen Einheiten, im Idealfall von allen taxonomischen Einheiten, zu amplifizieren. In nachfolgenden Analyseschritten wird die Identität der amplifizierten DNA bestimmt. Zu diesem Zwecke werden entweder weitere PCR-Schritte durchgeführt, die gegebenenfalls mit variablen, verschachtelten Primern bezüglich kleinerer taxonomischer Einheiten diskriminieren. Die finale Bestimmung einer taxonomischen Einheit kann außer mit variablen Primern auch mit spezifischen Sonden durchgeführt werden.

### Nukleotide

Nukleotide sind die Bausteine der DNA oder RNA. Dabei bedeuten die Abkürzungen: G = Guanosin, A = Adenosin, T = Thymidin, C = Cytidin, R = G oder A, Y = C oder T, K = G oder T, W = A oder T, S = C oder G, M = A oder C, B = C, G oder T, D = A, G oder T, H = A, C oder T, V = A, C oder G, N = A, C, G oder T, I = Inosin.

### Taxonomische Einheiten

Taxonomische Einheiten der Bakterien sind alle bekannten taxonomischen Unterteilungen, wie z.B. Reiche, Klassen, Abteilungen, Ordnungen, Familien, Gattungen, Arten, Stämme, Zwischeneinheiten dieser taxonomischen Einheiten, wie Unterklassen, Unterordnungen, Unterfamilien etc. oder Gruppen dieser taxonomischen Einheiten.

### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung umfaßt im wesentlichen 5 Teilaspekte, die die Erfindung in allgemeiner Form und in speziellen Aspekten widerspiegeln:

- Strategische Auswahl von DNA-Zielregionen unter Nutzung benachbarter Gene
- Beschreibung der Nutzung einer ribosomalen DNA-Region aus dem Ende der 23 S rDNA, dem transkribierten Spacer und Teilen der 5 S rDNA zum Nachweis aller Bakterien
- Bereitstellung von Primern und Sonden für eine Vielzahl von Bakterien



- Nachweis der Familie der Enterobakterien und deren Mitglieder
- Anwendung einer Konsensus-PCR zum Nachweis aller Bakterien

### Strategische Auswahl von DNA-Zielregionen unter Nutzung benachbarter Gene

Die Erfindung besteht in der Nutzung von Anteilen benachbarter Gene zum Nachweis von taxonomischen Einheiten, d.h. Reichen, Klassen, Abteilungen, Familien, Gattungen und Stämmen, sowie von Zwischenformen dieser Einheiten. Der Vorteil der Erfindung liegt darin, daß DNA-Bereiche, die zwei Gene überspannen bezüglich der Variabilität sehr heterogen zusammengesetzt sind, wie am Beispiel der ribosomalen Operons, insbesondere dem 23S/5S rDNA Abschnitt, gefunden wurde. Durch das Vorhandensein von sehr stark und sehr wenig konservierten Bereichen ist der Fachmann in die Lage versetzt, alle möglichen nahe und auch fern verwandten Organismen nachzuweisen.

### Beschreibung der Nutzung einer ribosomalen DNA-Region aus dem Ende der 23 S rDNA, dem transkribierten Spacer und Teilen der 5 S rDNA zum Nachweis aller Bakterien

Insbesondere ein 23 S-5 S rDNA Bereich umfassend ca. 400-750 Nukleotide kann zum Nachweis von Bakterien genutzt werden. Letztere Region besteht aus ca. 330-430 Nukleotiden des terminalen Bereichs der 23 S rDNA, dem anschließenden transkribierten Spacer und dem 5 S rDNA-Gen. In einzelnen Fällen kann zudem ein t-RNA-Gen in den Spacer insertiert sein und wird für den Nachweis mitgenutzt. Die beschriebene Region entspricht somit den Nukleotiden 2571-3112 der SEQ ID 1, welche die 23 S und 5 S rDNA-Gene von Escherichia coli darstellt. Durch einen dem Fachmann vertrauten Sequenzvergleich lassen sich die homologen und dem obigen Bereich entsprechenden Abschnitte anderer Bakterien bestimmen. Insbesondere bei Angehörigen gleicher Familien oder auch Ordnungen oder Abteilungen läßt sich der Beginn des oben skizzierten Bereichs am Terminus der 23 S rDNA-Gens und das Ende des 5 S rDNA-Gens durch einen Vergleich der ribosomalen DNA-Sequenzen zweier Arten A und B leicht bestimmen. Sollte dies für einen Vergleich der Arten A und einer weiter entfernten Art C nicht so leicht möglich sein, so kommt man zu dem gewünschten Ergebnis, indem man einen

Vergleich zwischen den Sequenzen der Arten B und C durchführt, wobei B und C miteinander näher verwandt sein sollten. Durch eine Reihe von separaten Sequenzvergleichen können auf diese Weise die der obigen Region entsprechenden homogenen ribosomalen Bereiche der 23 S rDNA, des transkribierten Spacers und der 5 S rDNA aller Eubakterien bestimmt werden. Aufgrund von Variabilität einzelner Subbereiche können dabei durchaus Längenunterschiede von mehreren hundert Nukleotiden auftreten. Des weiteren erlaubt die vorliegende Erfindung die Nutzung von Unterbereichen der oben beschriebenen Region. Ein Großteil dieser Bereiche ist in Tabelle 6 beschrieben.

#### Bereitstellung von Primern und Sonden für eine Vielzahl von Bakterien

Neben der generellen Beschreibung des nutzbaren rDNA-Bereichs werden auch Sequenzen (SEQ ID 1-530) bereitgestellt, die zum Zwecke des Nachweises von Bakterien verwendet werden können. Je nach Aufgabenstellung können dabei die in SEQ ID 1-530 spezifizierten Polynukleotide komplett verwendet werden, oder Fragmente aus diesen. Die unter SEQ ID 1-530 spezifizierten Sequenzen stammen dabei aus dem zuvor beschriebenen Bereich des 23 S-rDNA-Gens, transkribierten Spacers und 5 S rDNA-Gens.

In der technischen Ausführung kann der Nachweis von Organismen mit Hilfe der hierzu spezifizierten DNA-Bereiche und Sequenzen durch Sonden und/oder Primer erfolgen. Primer sind Nukleotide, die als Startermoleküle für die Amplifikation dienen. Sie lagern sich dabei an die Zielsequenz an, woraufhin die Region mit Hilfe einer Polymerase neu synthetisiert wird. Durch den Grad der Identität der Primer mit der Zielsequenz läßt sich deren Spezifität einstellen. Die taxonomische Spezifität wird zudem durch die Auswahl der Zielsequenz innerhalb des hierin beschriebenen ribosomalen Bereichs determiniert (s. auch Tabelle 6). Dementsprechend können Primer also auf verschiedene Weisen genutzt werden: so ist es z.B. möglich den gesamten Bereich entsprechend Abb. 2 oder homolog zu den Nukleotiden Nr. 2571-3112 der SEQ ID 1 (E. coli) mit den Primern SEQ ID 211 und 212 zu amplifizieren. Um die Amplifikation zu optimieren kann auch ein Gemisch von mehr als zwei Primern eingesetzt werden. Außerdem ist es möglich die Primer so zu wählen, daß nur die DNA bestimmter Bakterien amplifiziert wird. In diesem Fall geben sie also zweierlei Informationen: Erstens zeigen sie die Anwesenheit und zweitens die

Identität der gesuchten Bakterien im Falle positiver Amplifikation. Durch sequentielle Amplifikationsschritte mit verschachtelten Primern kann der Informationsausstoß am Ende der DNA-Synthese nach den Erfordernissen gelenkt werden.

In einem distinkten Schritt kann die DNA, die idealer Weise zuvor amplifiziert worden ist, mit Sonden gebunden, ankonzentriert und nachgewiesen werden. Sonden sind also Oligonukleotide oder Polynukleotide, die an einzelsträngige DNA-Abschnitte binden können. Die Affinität der Sonden zur Zielsequenz wird durch den Grad der Identität mit dieser bestimmt. Außerdem haben die Hybridisierungsbedingungen einen signifikanten Einfluß, d.h. Salzkonzentration der Puffer, Inkubationszeit und -temperatur müssen optimiert werden. Der Fachmann ist in der Lage diese Parameter mit Hilfe gängiger Methoden schnell zu optimieren. Exemplarische Hybridisierungsbedingungen sind in den Beispielen gegeben. Sonden können ganz analog wie Primer zweierlei leisten: erstens können sie die Anwesenheit von bakterieller DNA oder von Amplifikationsprodukten zeigen; zweitens können sie zur Detektion der DNA bestimmter Bakterien beitragen. In dieser Dualität ihrer Funktion gleichen sie also den Primern. Demzufolge kann es also zwischen Primern und Sonden zu einer Aufgabenteilung bei der Identifizierung von Organismen kommen. Außerdem können die Sonden ebenso wie die Primer aus frei wählbaren Bereichen des terminalen Bereichs der 23 S rDNA, des transkribierten Spacers oder der 5 S rDNA stammen oder auch den gesamten Bereich umfassen.

Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung liegt darin, daß der ausgewählte ribosomale Bereich gemäß Abb. 2 heterogen aus sehr variablen und sehr konservierten Regionen in einem extrem breiten Spektrum zusammengesetzt ist. Da es sehr viele Kombinationen in der Nutzung von Subregionen, z.B. gemäß Tabelle 6 gibt, bietet die vorliegende Erfindung eine Nachweismöglichkeit für alle bakteriellen Spezies und taxonomischen Einheiten.

#### Nachweis der Familie der Enterobakterien und deren Mitglieder

Mit Hilfe der hierin charakterisierten DNA-Zielregion können z.B. bakterielle Familien wie die Enterobacteriaceae nachgewiesen werden (Bsp. 1). Die Enterobakterien sind ei-

ne homogene taxonomische Einheit des  $\gamma$ -Zweiges der Proteobakterien oder Purpurbakterien. Sie sind deshalb von besonderem Interesse, weil ihnen viele pathogene Bakterien angehören, wie *Escherichia coli* (EHEC etc.), *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*. Sie eignen sich also als Markerorganismen, um den hygienischen Zustand von Lebensmitteln zu überprüfen. In der klinischen Mikrobiologie kann der Nachweis von Enterobakterien, einen ersten Schritt bei der Eingrenzung oder Identifizierung pathogener Keime darstellen. Aus der hierin enthaltenen Auflistung sind z.B. die Primer SEQ ID 2-25 in verschiedenen Kombinationen geeignet die Enterobakterien als Familie zu identifizieren. Viele der aufgelisteten Sequenzen sind außerdem geeignet einzelne Mitglieder der Enterobakterien, d.h. Gattungen, Spezies und Stämmen zu indentifizieren. Weitere Sequenzen werden auch für die übrigen taxonomischen Einheiten der Proteobakterien, insbesondere den gesamten  $\gamma$ -Zweig und außerdem für die Firmicutes bereitgestellt. Mit der Beschreibung der ribosomalen Region gemäß Abb. 2 wird ein weiterer Weg aufgezeigt, wie der Fachmann leicht weitere Sequenzen gewinnen kann, um alle Eubakterien nachzuweisen.

#### Anwendung einer Konsensus-PCR zum Nachweis aller Bakterien

Ein besonderer Vorteil unserer Erfindung liegt darin, daß die DNA-Zielregion, wie sie in Abb. 2 beschrieben ist, sich in idealer Weise in einer Konsensus-PCR nachweisen läßt. Eine wesentliche Voraussetzung für die experimentelle Anwendbarkeit dieser Methode ist, daß die Sequenzen innerhalb einer zu amplifizierenden Zielregion zunehmend variabel werden. Diese Konfiguration ist in dem von uns charakterisierten Bereich des ribosomalen Operons für alle untersuchten Spezies erfüllt.

Das Schema der Konsensus-PCR ist in Abb. 8 umrissen. In der Regel wird zunächst ein "Masterfragment" amplifiziert. Dieses kann dem Gesamtfragment entsprechend Abb. 2 gleichen oder ein Teil davon sein. Wenn nun in einer Probe verschiedene zu identifizierende Keime vorliegen, so wird für alle dieses Fragment amplifiziert. Die einzelnen Keime werden schließlich mit spezifischen Sonden und/oder in Kombination mit weiteren PCR-Schritten identifiziert. Der Nachweis mit Sonden kann auch miniaturisiert sein und auf Chips erfolgen. Alternativ kann ein Nachweis im klassischen ELISA-Verfahren

erfolgen. Die Komponenten des Bakteriennachweises können in Form eines Kits bereitgestellt werden.

Vorteilhaft zur Detektion sind insbesondere fluoreszierende Farbstoffe. Diese können an die Primer oder die Sonden gekoppelt werden. Insbesondere im ELISA oder in Southern Blot-Verfahren werden jedoch häufig auch nicht-fluoreszierende Farbstoffe verwendet. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises besteht mit der Genetrak- und Lightcycler-Technologie. Im Prinzip bieten alle diese Verfahren die Option eines quantitativen Nachweises. Es ist also möglich durch Auswertung des Detektionssignals letztendlich auf die Zahl der in einer Probe vorhandenen Bakterien rückzuschließen.

Der Nachweis von Bakterien mit Hilfe der vorliegenden Erfindung kann in einem experimentellen Kontext erfolgen, der dem Fachmann durchaus bekannt ist. So ist es möglich Bakterien vor dem Nachweis zunächst in einem geeigneten Medium anzureichern. Beim Arbeiten mit Lebensmitteln können physikalische Abtrennungsschritte, wie Zentrifugation der Sedimentation, eine vorteilhafte Ausführung darstellen. Es ist auch möglich die Bakterien so anzureichern, daß nachträglich Rückschlüsse auf die Ausgangskeimzahl möglich sind. Des weiteren können Grenzwertbestimmungen bezüglich der Keimzahl durchgeführt werden. Alles in allem ist also ein quantitativer oder semiquantitativer Keimnachweis möglich.

Zur Isolierung genomischer DNA werden die (angereicherten) Bakterien aufgeschlossen. Physikalische (Glasperlen, Hitze) und chemische (NaOH) Einflüsse liegen häufig den dem Fachmann bekannten Protokollen zum Zellaufschluß zugrunde. Es ist jedoch auch möglich Zellen direkt in eine PCR zum DNA-Nachweis einzusetzen. Außerdem kann es vorteilhaft sein, die genomische DNA, insbesondere wenn sie in Lebensmittelmatrizes verteilt ist, aufzureinigen. Auch diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt. DNA-Reinigungskits sind zudem kommerziell erhältlich.

**Tabelle 1.** Nachweis von Enterobakterien unter Ausgrenzung von anderen Bakterien (Beisp. 1)

Nr.	Arten	Stamm	Nachweis
1	<i>Budvicia aquatilis</i>	DSM 5025	+
2	<i>Buttiauxella agrestis</i>	DSM 4586	+
3	<i>Cedecea davisae</i>	DSM 4568	+
4	<i>Citrobacter koser</i>	DSM 4595	+
5	<i>Erwinia carotovora</i>	DSM 30168	+
6	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	DSM 4610	+
7	<i>Ewingella americana</i>	DSM 4580	+
8	<i>Enterobacter agglomerans</i>	B-5081-i	+
9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053	+
10	<i>Enterobacter sakazakii</i>	DSM 4485	+
11	<i>Enterobacter intermedius</i>	DSM 4581	+
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	+
13	<i>E. coli</i>	BC 7883	+
14	<i>E. coli</i>	H123	+
15	<i>E. coli</i>	BC 7884	+
16	<i>E. coli</i>	BC 7885	+
17	<i>E. hermanii</i>	B-4943a	+
18	<i>E. coli</i>	ATCC 8739	+
19	<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163	+
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	+
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026	+
22	<i>Klebsiella planticola</i>	DSM 4617	+
23	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5175	+
24	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	DSM 4583	+
25	<i>Morganella morganii</i>	DSM 30164	+
26	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	DSM 8224	+
27	<i>Pantoea ssp.</i>	B-5200	+
28	<i>Pantoea dispersa</i>	DSM 30073	+
29	<i>Proteus rettgeri</i>	DSM 1131	+
30	<i>Proteus rettgeri</i>	ATCC 14505	+
31	<i>Providencia stuartii</i>	DSM 4539	+
32	<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 4594	+
33	<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 4594	+
34	<i>Serratia proteamaculans</i>	DSM 4487	+
35	<i>Serratia ficaria</i>	DSM 4509	+

**Tabelle 1.** Nachweis von Enterobakterien unter Ausgrenzung von anderen Bakterien  
(Beisp. 1) - Fortsetzung -

Nr.	Arten	Stamm	Nachweis
36	<i>Serratia plymutica</i>	DSM 49	+
37	<i>Serratia rubidea</i>	DSM 4480	+
38	<i>Serratia marcescens</i>	DSM 1636	+
39	<i>Salmonella bongori</i>	DSM 7952	+
40	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992	+
41	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992	+
42	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4790	+
43	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 590	-
44	<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 6173	-
45	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	DSM 6394	-
46	<i>Fransilla tularensis</i> Isolat	F16	-
47	<i>Franziseella philomiragia</i>	DSM 7535	-
48	<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143	-
49	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	B-2397 A 13	-
50	<i>Pseudomonas beyjerinkii</i>	DSM 7218	-
51	<i>Vibrio fischeri</i>	DSM 507	-
52	<i>Vibrio alginolyticus</i>	DSM 2171	-
53	<i>Vibrio proteolyticus</i>	DSM 30189	-
54	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DSM 10027	-
55	<i>Vibrio harveyi</i>	DSM 6104	-
56	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	BC 4273	-
57	<i>Achromobacter xyloso</i>	DSM 2402	-
58	<i>Alcaligenes</i> spp	DSM 2625	-
59	<i>Alcaligenes latus</i>	DSM 1122	-
60	<i>Brucella neotomae</i>	ATCC 25840	-
61	<i>Brucella ovis</i>	ATCC 23459	-
62	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM 20680	-
63	<i>Flavobacterium</i> sp.	ATCC 27551	-
64	<i>Flavobacterium resinovorum</i>	DSM 7438	-
65	<i>Flavobacterium johnsonii</i>	DSM 2064	-
66	<i>Flavobacterium flavense</i>	DSM 1076	-
67	<i>Lactobacillus bifidus</i>	BC 8463	-
68	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	DSM 1098	-
69	<i>Pseudomonas cepacia</i>	DSM 3134	-
70	<i>Sphingobacterium multivorans</i>	DSM 6175	-

**Tabelle 2.** Nachweis von *Pantoea dispersa* unter Ausgrenzung von anderen Bakterien (Beisp. 2)

Nr.	Art	Nachweis
1	<i>Pantoea dispersa</i>	+
2	<i>Budvicia aquatica</i>	-
3	<i>Buttiauxella agrestis</i>	-
4	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
5	<i>Erwinia carotovora</i>	-
6	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-
7	<i>Escherichia coli</i>	-
8	<i>Escherichia vulneris</i>	-
9	<i>Escherichia hermannii</i>	-
10	<i>Hafnia alvei</i>	-
11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
12	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-
13	<i>Morganella morganii</i>	-
14	<i>Proteus mirabilis</i>	-
15	<i>Proteus rettgeri</i>	-
16	<i>Proteus stuartii</i>	-
17	<i>Providencia stuartii</i>	-
18	<i>Rahnella aquatilis</i>	-
19	<i>Serratia ficaria</i>	-
20	<i>Serratia fonticola</i>	-
21	<i>Serratia marcescens</i>	-
22	<i>Serratia plymuthica</i>	-
23	<i>Serratia proteamaculans</i>	-
24	<i>Serratia rubidea</i>	-
25	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
26	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
27	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-
28	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	-
29	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
30	<i>Cedecea davisae</i>	-
31	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
32	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-



**Tabelle 2.** Nachweis von *Pantoea dispersa* unter Ausgrenzung von anderen Bakterien (Beisp. 2) - Fortsetzung -

Nr.	Art	Nachweis
33	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-
34	<i>Stenotrophomonas multophila</i>	-
35	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-
36	<i>Vibrio fisheri</i>	-
37	<i>Vibrio harveyi</i>	-
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
39	<i>Alcaligenes</i> sp.	-
40	<i>Bacillus subtilis</i>	-
41	<i>Brucella abortus</i>	-
42	<i>Brucella ovis</i>	-
43	<i>Flavobacterium resinovorum</i>	-
44	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	-
45	<i>Pseudomonas cepacia</i>	-
46	<i>Ralstonia pickettii</i>	-
47	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	-
48	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
49	<i>Streptococcus faecalis</i>	-

**Tabelle 3: Nachweis einer Gruppe von Gattungen mit der Sonde  
GTTCCGAGATTGGTT**

Nr.	Art	Nachweis
1	<i>Rahnella aquatilis</i>	+
2	<i>Serratia ficaria</i>	+
3	<i>Serratia fonticola</i>	+
4	<i>Serratia marcescens</i>	+
5	<i>Serratia plymuthica</i>	+
6	<i>Serratia proteamaculans</i>	+
7	<i>Serratia rubidea</i>	+
8	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+
9	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+
10	<i>Budvicia aquatica</i>	-
11	<i>Buttiauxella agrestis</i>	-
12	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
13	<i>Erwinia carotovora</i>	-
14	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-
15	<i>Escherichia coli</i>	-
16	<i>Escherichia vulneris</i>	-
17	<i>Escherichia hermannii</i>	-
18	<i>Hafnia alvei</i>	-
19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
20	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-
21	<i>Morganella morganii</i>	-
22	<i>Pantoea dispersa</i>	-
23	<i>Proteus mirabilis</i>	-
24	<i>Proteus rettgeri</i>	-
25	<i>Proteus stuartii</i>	-
26	<i>Providencia stuartii</i>	-
27	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-
28	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	-
29	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-

**Tabelle 3: Nachweis einer Gruppe von Gattungen mit der Sonde****GTTCCGAGATTGGTT****- Fortsetzung -**

<b>Nr.</b>	<b>Art</b>	<b>Nachweis</b>
30	<i>Cedecea davisae</i>	-
31	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
32	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
33	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-
34	<i>Stenotrophomonas multophila</i>	-
35	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-
36	<i>Vibrio fisheri</i>	-
37	<i>Vibrio harveyi</i>	-
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
39	<i>Alcaligenes sp.</i>	-
40	<i>Bacillus subtilis</i>	-
41	<i>Brucella abortus</i>	-
42	<i>Brucella ovis</i>	-
43	<i>Flavobacterium resinovororum</i>	-
44	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	-
45	<i>Pseudomonas cepacia</i>	-
46	<i>Ralstonia pickettii</i>	-
47	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	-
48	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
49	<i>Streptococcus faecalis</i>	-

**Tabelle 4: Spezifische Sonden zum Nachweis von bakterieller Gattungen und Arten**

Nr.	Sonde SEQ ID	Nachweis Gattung/Art
1	96	<i>Budvicia aquatica</i>
2	97	<i>Buttiauxella agrestis</i>
3	98	<i>Enterobacter agglomerans</i>
4	99	<i>Erwinia carotovora</i>
5	100	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
6	101	<i>Escherichia coli</i>
7	102	<i>Escherichia hermannii</i>
8	103	<i>Escherichia vulneris</i>
9	104	<i>Hafnia alvei</i>
10	105	<i>Klebsiella oxytoca</i>
11	106	<i>Kluyvera cryoescens</i>
12	107	<i>Morganella morganii</i>
13	108, 109	<i>Pantoea</i>
14	110	<i>Proteus mirabilis</i>
15	111	<i>Proteus rettgeri</i>
16	112	<i>Providencia stuartii</i>
17	113	<i>Rahnella aquatilis</i>
18	114	<i>Serratia ficaria</i>
19	115	<i>Serratia fonticola</i>
20	116	<i>Serratia marcescens</i>
21	117	<i>Serratia plymuthica</i>
22	118	<i>Serratia proteamaculans</i>
23	119	<i>Serratia rubidea</i>
24	120	<i>Yersinia enterocolitica</i>
25	121	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
26	122	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
27	123	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>
28	124	<i>Aeromonas hydrophila</i>
29	125	<i>Cedecea davisae</i>
30	126	<i>Haemophilus influenzae</i>
31	127	<i>Moraxella catarrhalis</i>
32	128	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
33	129	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

**Tabelle 4:** Spezifische Sonden zum Nachweis von bakterieller Gattungen und Arten  
- Fortsetzung 1/2 -

Nr.	Sonde SEQ ID	Nachweis Gattung/Art
34	130	<i>Vibrio alginolyticus</i>
35	131	<i>Vibrio fisheri</i>
36	132	<i>Vibrio harveyi</i>
37	133	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
38	134	<i>Vibrio proteolyticus</i>
39	432	<i>Salmonella typhi</i>
40	433	<i>Buchnera aphidicola</i>
41	434	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
42	435	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
43	436	<i>Agrobacterium vitis</i>
44	437	<i>Adalia bipunctata</i>
45	438	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
46	439	<i>Brucella</i>
47	440	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
48	441	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
49	442	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
50	443	<i>Rickettsia prowazekii</i>
51	444	<i>Pseudomonas cepacia</i>
52	445	<i>Ralstonia pickettii</i>
53	446	<i>Campylobacter jejuni</i>
54	447	<i>Helicobacter pylori</i>
55	448	<i>Actinoplanes utahensis</i>
56	449	<i>Bacillus halodurans</i>
57	450	<i>Bacillus subtilis</i>
58	451	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
59	452	<i>Frankia</i>
60	453	<i>Microbispora bispora</i>
61	454	<i>Mycobacterium leprae</i>
62	455	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
63	456	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
64	457	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>

**Tabelle 4:** Spezifische Sonden zum Nachweis von bakterieller Gattungen und Arten  
- Fortsetzung 2/2 -

Nr.	Sonde SEQ ID	Nachweis Gattung/Art
65	458	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
66	459	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
67	460	<i>Rhodococcus fascians</i>
68	461	<i>Staphylococcus aureus</i>
69	462	<i>Streptococcus faecalis</i>
70	463	<i>Streptomyces ambifaciens</i>
71	464	<i>Streptomyces galbus</i>
72	465	<i>Streptomyces griseus</i>
73	466	<i>Streptomyces lividans</i>
74	467	<i>Streptomyces mashuensis</i>
75	468	<i>Flavobacterium resinovorum</i>
76	469	<i>Sphingobacterium multivorans</i>
77	470	<i>Synechococcus</i>
78	471	<i>Synechocystis</i>
79	472	<i>Borrelia burgdorferi</i>
80	473	<i>Chlamydia trachomatis</i>
81	474	<i>Azotobacter vinelandii</i>
82	475	<i>Cowdria ruminantium</i>
83	476	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
84	477	<i>Mycobacterium lufu</i>
85	478	<i>Mycobacterium simiae</i>
86	479	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
87	480	<i>Saccharomonospora azurea</i>
88	481	<i>Saccharomonospora caesia</i>
89	482	<i>Saccharomonospora cyanea</i>
90	483	<i>Saccharomonospora glauca</i>
91	484	<i>Saccharomonospora viridis</i>
92	485	<i>Wolbachia pipientis</i>
93	525	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
94	526	<i>Zymomonas mobilis</i>
95	527	<i>Alcaligenes</i>
96	528	<i>Borrelia burgdorferi</i>
97	529	<i>Xanthomonas campestris</i>
98	530	<i>Cowdria ruminantium</i>

Tabelle 5: Primer zum Nachweis von Bakterienarten oder Gattungen

Nr.	verwendete Spezies	SEQ ID	vorwärts-Primer	rückwärts-Primer (rückwärts-Primer* = komplementär)
1	<i>Budvicia aquatica</i>	96	CGAGGTGTTTAAAGGAAAGTT	CGGTCAATAGACAGAAATAT
2	<i>Buttiauxellis agrestis</i>	97	CGAAGGTGTTTGGTTGAGAG	GGTTGATGAAACAGAAATAT
4	<i>Enterobacter agglomerans</i>	98	CGAAGATGTTTGGCGGATTG	GTTTCTGGCAACAGAAATTT
5	<i>Erwinia carotovora</i>	99	CGAAGGTGTTTGGAGATGAC	TGGGATGAAACAGAAATTT
6	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	100	CGAAGGTGTTTGGAGAGATT	TCGGGATGAAACAAAAATTT
7	<i>Escherichia coli</i>	101	CGAAGCTGTTTGGCGGATGA	GTCTGATAAAACAGAAATTT
8	<i>Escherichia hermannii</i>	102	CAGAGTGGTTTGGTGTTCGG	CAGCAGGTGAACAGAAATTT
9	<i>Escherichia vulneris</i>	103	CGAAGATGTTTGGCGGATTT	CGTCAGACAGACAGAAATTT
10	<i>Hafnia alvei</i>	104	CGAAGGTGTTTAAACACGCAG	GGTACAAAATAACAGAAATAT
11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	105	CGAAGATGTTTGGCGAATTTG	GTTTCTGACAACAGAAATTT
12	<i>Kluyvera cryocens</i>	106	CAAAGATGTTTGGTGAAAAG	CGGGTTAATAACAGAAATTT
13	<i>Morganella morganii</i>	107	CGAAGGTGTTTGGAGTTGAGA	TTTGATTGAAATGAAATTT
14	<i>Pantoea dispersa</i>	108	CAGAGCGGTTTGGTCTGAGA	GCGGTNTAAAACAAAAATTT
15	<i>Pantoea ssp.</i>	109	CGAAGATGTTTGGCGGAATG	GTTTCTGGCAACAGAAATTT
16	<i>Proteus mirabilis</i>	110	CGAAAGTGTTTGTGCAGAGAG	AGTGATTAAAAACCGAAATTT
17	<i>Proteus rettgeri</i>	111	CGAAGGTGTTTGGAGAGATA	CGGGAACAAAACAGAAATTT
18	<i>Providencia stuartii</i>	112	CGAAGGTGTTTGGAGAGACG	ACGGGAACGAAACCGAAATTT
19	<i>Rahnella aquatilis</i>	113	CGAAGGTGTTTGGATTGAG	TATGAATGAAACAGAAATTT
20	<i>Salmonella typhi</i>	432	CGAAGGTGTTTGGAGGATAA	GATAAAAGAAACAGAAATTT

Tabelle 5: Primer zum Nachweis von Bakterienarten oder Gattungen

- Fortsetzung -

Nr.	verwendete Spezies	SEQ ID	vorwärts-Primer	rückwärts-Primer (rückwärts-Primer* = komplementär)
21	<i>Serratia ficaria</i>	114	CGAAGGTGTTTAGAGAGCG	CAAGAATGAAACACAGAAATT
22	<i>Serratia fonticola</i>	115	CCAAGGTGTTTGAAGAGATT	TTGAAATGAAACACAGAAATT
23	<i>Serratia marcescens</i>	116	CGAAGGTGTTTTAGAGAGAT	TTGGAATGAAACACAGAAATT
24	<i>Serratia plymuthica</i>	117	CGAAGGTGTTTAGAGAGATT	TTGGAATGAAACACAGAAATT
25	<i>Serratia proteamaculans</i>	118	CAAAGGTGTTTAGAGAGATT	TTGGAATGAAACACANAAATT
26	<i>Serratia rubidea</i>	119	CGAAGGTGTTTAGAGAGATT	TCGGGATGAAACACAGAAATT
27	<i>Yersinia enterocolica</i>	120	CAAAGGTGTTTGTATTGAG	GTTAGTTTAGACAGAAATT
28	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	122	CCAAGCAGTTGTATATAAAGC	GCAACCAATAAGACCAATG
29	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	123	CCAAGAAAGTGTNTGGTGCT	TTCCAAGATTGAAGAAATT
30	<i>Aeromonas hydrophila</i>	124	CCAAGAAAGTGTCTAAGGCTT	TTCTCAGATTGAAGAAATT
31	<i>Buchnera aphidicola</i>	433	CCAGAGGTGTTTTTATAAAA	ATCTTGTTTTACTGAATT
32	<i>Haemophilus influenzae</i>	126	GCTCAAGTGTGTTTGGGAGCT	CGGTCAGTAAACAGAAATT
33	<i>Moraxella catarrhalis</i>	127	ACCCAAGTGGTTTACCACCTGA	GTAATAAACACAGACTCATAC
34	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	128	ACCAAATTGTTTATCGTAAC	AGTTGTTATAATAAACAT
35	<i>Vibrio alginolyticus</i>	130	CCAAGGGGTTTGTATGGACTC	TTTCCAGATTAAAGAAATT
36	<i>Vibrio fischeri</i>	131	CCAAGTGGTTTGTATCAAGCA	TTAAGTAAACAAACACAG
37	<i>Vibrio harveyi</i>	132	CCAAGGGGTTTGTATGGACTC	TTTCCAAATTAAAGAAATT
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	133	CCAAGGGGTTTGTATGGACTC	TTTCCGAATTAAAGAAATT
39	<i>Vibrio proteolyticus</i>	134	CCAAGGGGTTTGTATGGACTC	TTGTTCAGACAAAATT



**Tabelle 6:** Nachweispotentiale und Spezifikation der Lokalisation von DNA-Fragmenten aus dem rDNA-Operon

Nr. in Abb. 2	DNA-Bereich	Position in SEQ ID 1	Nachweispotentiale
1.	terminaler Bereich des 23 S rDNA-Gens	2667-2720	Abteilungen, Klassen, Ordnungen, Familien
2.	terminaler Bereich des 23 S rDNA-Gens	2727-2776	Abteilungen, Klassen, Ordnungen, Familien
3.	terminaler Bereich des 23 S rDNA-Gens	2777-2800	Abteilungen, Klassen, Ordnungen, Familien
4.	terminaler Bereich des 23 S rDNA-Gens	2801-2838	Klassen, Ordnungen, Familien
5.	Ende des 23 S rDNA-Gens	2857-2896	Abteilungen, Klassen, Ordnungen, Familien
6.	Beginn des 23 S-5 S transkribierten Spacers	2897-2938	Ordnungen, Familien, Gattungen, Arten, Stämme
7.	23 S-5 S transkribierter Spacer	2939-2983	Gattungen, Arten, Stämme
8.	Ende des 23 S-5 S transkribierten Spacers	2984-2999	Familien, Gattungen, Arten, Stämme
9.	Beginn des 5 S rDNA-Gens	3000-3032	Abteilungen, Klassen, Ordnungen, Familien

**Tabelle 7:** Primer aus Beispiel 1

vorwärts-Primer	rückwärts-Primer	Annealing-temperatur (°C)	Abbildung
SEQ ID 2	SEQ ID 7-22	62	3
SEQ ID 2	SEQ ID 23-24	62	4
SEQ ID 2	SEQ ID 25	67	5
SEQ ID 3-6	SEQ ID 23-24	62	6
SEQ ID 3-6	SEQ ID 25	67	7

Tabelle 8: Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1 SEQ ID	Primer B1 SEQ ID	Primer C1 SEQ ID	Primer D1 SEQ ID	Primer E1 SEQ ID	Primer F1 SEQ ID	Primer G1 SEQ ID	Primer H1 SEQ ID	Primer B2 SEQ ID	Primer A2 SEQ ID
1	Enterobakterien	1	7-22							4	5
2	Enterobakterien	26	34	42	54	66	78	85			135
3	Acinetobacter	27	35	43	55	67	79				
4	Aeromonas	28	36	44	56	68	80	87			155
5	Haemophilus	29	37	45	57	69	81				
6	Moraxella	30	38	46	58	70	82				
7	Pasteurella	31	39	47	59						
8	Stenotrophomonas	32	40	48	60	72		90			
9	Vibrio	33	41								
10	Vibrio alginolyticus			49	61	73		91	130		160
11	Vibrio fischeri			50	62	74		92	131		161
12	Vibrio harveyi			51	63	75		93	132		162
13	Vibrio parahaemolyticus			52	64	76		94	133		163
14	Vibrio proteolyticus			53	65	77		95	134		163
15	Pasteurella pneumotropica					71	83		128		158
16	Acinetobacter calcoaceticus							86	122		154
17	Haemophilus influenzae							88	126		156
18	Moraxella catarrhalis							89	127		157
19	Budvicia aquatica				166				96		135
20	Buttiauxella agrestis			187	167				97		136

Tabelle 8: Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 1/6 -

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1 SEQ ID	Primer B1 SEQ ID	Primer C1 SEQ ID	Primer D1 SEQ ID	Primer E1 SEQ ID	Primer F1 SEQ ID	Primer G1 SEQ ID	Primer H1 SEQ ID	Primer B2 SEQ ID	Primer A2 SEQ ID
21	<i>Enterobacter agglomerans</i>			188	168				98		
22	<i>Erwinia carotovora</i>			189	169				99		
23	<i>Erwinia chrysanthemi</i>			190	170				100		138
24	<i>Escherichia coli</i>			187	171				101		139
25	<i>Escherichia hermannii</i>			191	172				102		140
26	<i>Escherichia vulneris</i>			192	173				103, 165		141
27	<i>Hafnia alvei</i>			193	174				104		142
28	<i>Klebsiella oxytoca</i>			187	175				105, 165		143
29	<i>Kluyvera cryocrescens</i>			187	175				106		144
30	<i>Morganella morganii</i>			194	176				107		145
31	<i>Pantoea dispersa</i>			187	177				108, 165		146
32	<i>Pantoea</i>			188	178				109, 165		147
33	<i>Proteus mirabilis</i>			195	179				110		
34	<i>Proteus rettgeri</i>			196	180				111		148
35	<i>Providencia stuartii</i>			197	181				112		149
36	<i>Rahnella aquatilis</i>			198	182				113, 164		149
37	<i>Serratia ficaria</i>								114, 164		150

**Tabelle 8:** Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 2/6 -

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1 SEQ ID	Primer B1 SEQ ID	Primer C1 SEQ ID	Primer D1 SEQ ID	Primer E1 SEQ ID	Primer F1 SEQ ID	Primer G1 SEQ ID	Primer H1 SEQ ID	Primer B2 SEQ ID	Primer A2 SEQ ID
38	<i>Serratia fonticola</i>								115, 164		
39	<i>Serratia marcescens</i>								116, 164		
40	<i>Serratia plymuthica</i>								117, 164		
41	<i>Serratia proteamaculans</i>								118, 164		
42	<i>Serratia rubidea</i>								119, 164		
43	<i>Yersinia enterocolitica</i>			199	184				120, 164		152
44	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>			200	185				121, 164		153
45	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>								123		
46	<i>Aeromonas hydrophila</i>								124		
47	<i>Cedecea davisae</i>			201	186				125		
48	<i>Stenotrophomonas multophila</i>								129		159
49	<i>Enterobacter agglomerans</i>								137, 165		
50	<i>Serratia</i>				183						151
51	<i>Citrobacter</i>								202, 203		
52	<i>Salmonella</i>							204-210			
53	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	213	252	289	326	361	403		434		488

**Tabelle 8:** Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 3/6 -

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1 SEQ ID	Primer B1 SEQ ID	Primer C1 SEQ ID	Primer D1 SEQ ID	Primer E1 SEQ ID	Primer F1 SEQ ID	Primer G1 SEQ ID	Primer SEQ ID	Primer B2 SEQ ID	Primer A2 SEQ ID
54	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	214	253	290	327	362	404		435		489
55	<i>Agrobacterium vitis</i>	215	254	291	328	363			436		490
56	<i>Adalia bipunctata</i>	216	255	292	329	364			437		491
57	<i>Amicylatopsis orientalis</i>	217	256	293	330				438		
58	<i>Brucella ovis</i>	218	257	294	331	365			439		492
59	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	219	258	295	331	366			440		493
60	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	220	259	296	332	367			441		494
61	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	221	260	297	333	368			442		495
62	<i>Rickettsia prowazekii</i>	222	261	298	333	369			443		496
63	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	223	262	299	334	370	405		525		499
64	<i>Zymomonas mobilis</i>	224	263	300	335	371			526		500
65	<i>Alcaligenes</i>	225	264	301	336	372	406		527		501
66	<i>Pseudomonas cepacia</i>	226	265	302	337		407		444		502
67	<i>Ralstonia pickettii</i>	227	266	303	338	373	408		445		503
68	<i>Campylobacter jejuni</i>	228	267	304	339	374	409		446		
69	<i>Helicobacter pylori</i>	229	268	305	340	375	410		447		504
70	<i>Actinoplanes utahensis</i>	230	269	306	341		411		448		

Tabelle 8: Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 4/6

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1 SEQ ID	Primer B1 SEQ ID	Primer C1 SEQ ID	Primer D1 SEQ ID	Primer E1 SEQ ID	Primer F1 SEQ ID	Primer G1 SEQ ID	Primer H1 SEQ ID	Primer B2 SEQ ID	Primer A2 SEQ ID
71	<i>Bacillus halodurans</i>	231	270	307	342	376	412		449		505
72	<i>Bacillus subtilis</i>	232			343	377	413		450		506
73	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	233	271	308	344	378	414		451		507
74	<i>Frankia</i>	234	272	309	345	379	415		452		508
75	<i>Microbispora bisporea</i>	235	273	310	346	380	416		453		509
76	<i>Mycobacterium leprae</i>	236	274	311	347	381	417		454		510
77	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	237	275	312	348	382	418		455		511
78	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	238	276	313	349	383	419		456		512
79	<i>Mycobacterium gallisepticum</i>	239	277	314		384	420		457		
80	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	240	278	315	350	385	421		458		
81	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	241	279	316	351	386	422		459		513
82	<i>Rhodococcus fascians</i>	242				387	423		460		514
83	<i>Staphylococcus aureus</i>	243	280	317	352	388	424		461		515
84	<i>Streptococcus faecalis</i>	244	281	318	353	389	425		462		516
85	<i>Streptomyces ambifaciens</i>	245	282	319	354	390	426		463		517
86	<i>Flavobacterium resinovorum</i>	246	283	320	355	395	428		468		519
87	<i>Sphingobacterium multivorans</i>	247	284	321	356	396			469		520

**Tabelle 8:** Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 5/6 -

Nr.	taxonomische Einheit	Primer A1		Primer B1		Primer C1		Primer D1		Primer E1		Primer F1		Primer G1		Primer H1		Primer B2		Primer A2	
		SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
88	<i>Synechococcus</i>	248	285	322	357	397	429							470						521	
89	<i>Synechocystis</i>	249	286	323	358	398	430							471						522	
90	<i>Borrelia burgdorferi</i>	250	287	324	359	399								472, 428						523	
91	<i>Chlamydia trachomatis</i>	251	288	325	360	400	431							473						524	
92	<i>Streptomyces galbus</i>					391	426							464							
93	<i>Streptomyces griseus</i>					392	426							465						518	
94	<i>Streptomyces lividans</i>					393	426							466						518	
95	<i>Streptomyces mashuensis</i>					394	427							467							
96	<i>Salmonella typhi</i>						401							432						486	
97	<i>Buchnera aphidocola</i>													433						487	
98	<i>Brucella orientalis</i>													439						492	
99	<i>Brucella abortus</i>													439						492	
100	<i>Azotobacter vinelandii</i>													474							
101	<i>Cowduria ruminantium</i>													475, 530							
102	<i>Mycobacterium intracellulare</i>													476							
103	<i>Mycobacterium lufu</i>													477							
104	<i>Mycobacterium simiae</i>													478							

**Tabelle 8:** Konsensus-PCR zum Nachweis von Bakterien  
- Fortsetzung 6/6 -

[illegible]



### Patentansprüche

1. Nukleinsäuremoleküle als Sonde und/oder Primer zum Nachweis von Bakterien, ausgewählt aus
  - a) Nukleinsäuremoleküle, umfassend, mindestens eine Sequenz mit einer der SEQ ID-Nr. 1 bis 530 und/oder eine Sequenz aus Position 2667 bis 2720, 2727 bis 2776, 2777 bis 2801, 2801 bis 2832, 2857 bis 2896, 2907 bis 2931, 2983 bis 2999 und/oder 3000 bis 3032 gemäß SEQ ID Nr. 1; bzw. hierzu homologen, analogen oder zu mindestens 70 % identischen Nukleinsäuren,
  - b) Nukleinsäuremolekülen, die spezifisch mit einer Nukleinsäure nach a) hybridisieren;
  - c) Nukleinsäuremolekülen, die 70 %, vorzugsweise mindestens 90 % Identität zu einer Nukleinsäure nach a) oder b) aufweist,
  - d) Nukleinsäuremolekülen, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach a) bis c) sind.
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mindestens 10 Nukleotide, vorzugsweise mindestens 14 Nukleotide lang ist.
3. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide in 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide aus dem 10er-Block durch Nukleotide ersetzt sind, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.
4. Nukleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül so modifiziert bzw. markiert ist, daß es in an sich bekannten analytischen Nachweisverfahren ein Signal erzeugen kann,

wobei die Modifikation ausgewählt wird aus (i) radioaktiven Gruppen (ii) farbigen Gruppen, (iii) fluoreszierenden Gruppen, (iv) Gruppen zur Immobilisierung von einer festen Phase und (v) Gruppen, die eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, erlauben.

5. Kombination aus mindestens 2 Nukleinsäuremolekülen ausgewählt aus
  - a) einer Kombination mindestens eines DNA-Moleküls, die gegenüber der Sequenz SEQ ID-Nr. 1, Position 2571 bis 2906, verkürzt ist und mindestens eines DNA-Moleküls, das gegenüber dem transkribierten Spacer zwischen den 23 S- und 5 S-Genen entsprechend der Position 2907 bis 2999 in SEQ ID-Nr. 1 verkürzt oder nicht verkürzt ist, oder hierzu homologen, analogen oder zu mindestens 75 % identischen DNA-Molekülen;
  - b) einer Kombination mindestens eines DNA-Moleküls, das gegenüber dem transkribierten Spacer zwischen den 23 S und 5 S-Genen, der Position 2907 bis 2999 aus SEQ ID-Nr. 1 verkürzt oder nicht verkürzt ist und mindestens eines DNA-Moleküls, das gegenüber dem 5 S rDNA Gen mit der Sequenz zwischen Position 3000 bis 3112 aus SEQ ID-Nr. 1, verkürzt ist; oder hierzu homologen, analogen oder zu mindestens 75 % identischen DNA-Molekülen;
  - c) einer Kombination mindestens eines DNA-Moleküls, das gegenüber dem 23 S-Gen mit der Sequenz von Position 2907 bis 2999 aus SEQ ID-Nr. 1 verkürzt oder nicht verkürzt ist und mindestens eines verkürzten DNA-Moleküls aus dem 5 S rDNA-Gen von Position 3000 bis 3112 aus SEQ ID-Nr. 1, oder hierzu homologen, analogen oder zu mindestens 75 % identischen DNA-Molekülen;
  - d) einer Kombination mindestens eines DNA-Moleküls, das gegenüber dem 23 S-Gen mit Sequenz von Position 2571 bis 2906 der SEQ ID-Nr. 1 verkürzt ist und mindestens eines verkürzten DNA-Moleküls aus dem 5 S rDNA-Gen von Position

3000 bis 3112 aus SEQ ID-Nr. 1 oder hierzu homologen, analogen oder zu mindestens 75 % identischen DNA-Moleküls,

e) einer Kombination aus 2 Nukleinsäuremolekülen nach Anspruch 1;

f) einer Kombination, die mindestens ein DNA-Molekül enthält, das mit einem Bereich hybridisiert, der mindestens 100 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende der 23S rDNA, also innerhalb der 23S rDNA, hybridisiert;

wobei die Kombination gemäß a) bis f) auch ein zusammengesetztes Nukleinsäuremolekül sein kann, das mindestens 15 Basenpaare umfaßt, zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, vorzugsweise von Enterobakterien.

6. Kit, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül oder eine Kombination an Nukleinsäuremolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien, vorzugsweise Enterobakterien, in einer Analysenprobe, umfassend den Schritt Inkontaktbringen der Analysenprobe mit einer Nukleinsäure oder einer Kombination an Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und Nachweis geeigneter Hybridnukleinsäuren, umfassend die eingebrachte Nukleinsäure und bakterielle Nukleinsäure.
8. Verfahren zur Amplifikation bakterieller DNA einer Vielzahl verschiedener taxonomischer Einheiten, insbesondere Gattungen und Arten, unter Verwendung von Primern nach den Ansprüchen 1 - 5, wobei

in einem ersten Amplifikationsschritt die DNA für hohe taxonomische Einheiten wie Klassen, Abteilungen oder Familien, mit konservierten Primern amplifiziert werden und gegebenenfalls in mindestens einem weiteren Amplifikationsschritt (EN) mit verschachtelten, zunehmend variablen Primern, Teile des ersten Amplifikationsfragmentes, die spezifisch für Gattungen, Arten oder Spezies sind, vermehrt werden können und ggf. in einem weiteren Schritt die durch Amplifikation erhalte-

nen DNA-Fragmente, die für Gattungen, Arten oder Spezies spezifisch sind, mit Hilfe von Sonden nachgewiesen werden.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren eine PCR-Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure umfaßt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren eine Southernblothybridisierung umfaßt.
11. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis von Bakterien bzw. bakterieller Nukleinsäuren
12. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Nachweis eine Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) umfaßt.
13. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Nachweis eine Ligase-Kettenreaktion umfaßt.
14. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Nachweis eine isotherme Nukleinsäureamplifikation umfaßt.
15. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien.
16. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 211 und/oder Nr. 212 oder hiervon abgeleiteter Derivate wie in Anspruch 1 a) bis d) definiert zum Nachweis beliebiger Eubakterien oder taxonmischer Einheiten der Eubakterien.
17. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 1 bis 26, 34, 42, 54, 66, 78, 85, 135 bis 153, 166 bis 201, 96 bis 121, 125 und/oder 202 bis 212 nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis der Familie

der Enterobacteriaceae oder eines beliebigen Bakteriums der Familie der Enterobacteriaceae.

18. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 2 bis 95, 135 bis 201, 211 bis 214, 252, 253, 289, 290, 326, 327, 361, 362, 401, 402 und/oder 486 nach Anspruch 1 zum Nachweis des  $\gamma$ -Zweigs der Proteobakterien oder eines beliebigen Bakteriums des  $\gamma$ -Zweigs der Proteobakterien.
19. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 251, 288, 325, 326, 400, 431 und/oder 524 nach Anspruch 1 zum Nachweis der Gruppe der Chlamydiales oder Verrumicrobia oder eines beliebigen Bakteriums aus der Gruppe der Chlamydiales oder Verrumicrobia.
20. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 248, 285, 322, 357, 397, 429, 521, 249, 286, 323, 358, 398, 430 und/oder 522 nach Anspruch 1 zum Nachweis der Gruppe der Cyanobacteria oder eines beliebigen Bakteriums aus der Gruppe der Cyanobacteria.
21. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 395, 428, 519, 246, 283, 320, 355, 520, 247, 284, 321, 356 und/oder 396 nach Anspruch 1 zum Nachweis der Gruppe der Cytophagales oder der Gruppe der grünen Schwefelbakterien oder eines beliebigen Bakteriums der Gruppe der Cytophagales oder der Gruppe der grünen Schwefelbakterien.
22. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 230 bis 245, 269 bis 282, 306 - 319, 341 - 354, 376 - 394, 411 bis 427 und/oder 505 bis 518 nach Anspruch 1 zum Nachweis der Gruppe der Firmicutes oder grampositiven Bakterien oder eines beliebigen Bakteriums aus der Gruppe der Firmicutes oder grampositiven Bakterien.
23. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 250, 287, 324, 359, 399 und/oder 523 nach Anspruch 1 zum Nachweis der

Gruppe der Spirochaetales oder eines beliebigen Bakteriums aus der Gruppe der Spirochaetales.

24. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 42, 96, 135 und/oder 166 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung Budvicica,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Budvicica,  
oder beliebige Stämme der Gattung Budvicica,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist..

25. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 42, 114-119, 151, 164 und/oder 183 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung Serratia,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Serratia,  
oder beliebige Stämme der Gattung Serratia,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist

26. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 96, 125, 186 und/oder 201 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung Cedecea,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Cedecea,  
oder beliebige Stämme der Gattung Cedecea,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist

27. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 97, 136, 167 und/oder 187 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

es die Gattung Buttiauxella,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Buttiauxella,  
oder beliebige Stämme der Gattung Buttiauxella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

28. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 98, 137, 165, 168 und/oder 188 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

es die Gattung Enterobacter,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Enterobacter,  
oder beliebige Stämme der Gattung Enterobacter,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist

29. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 99, 100, 138, 139, 169, 170, 189 und/oder 190 nach Anspruch 1 zum Nach-

weis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Erwinia*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Erwinia*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Erwinia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

30. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 1, 1013, 140-142, 165, 171-173, 187, 191 und/oder 192 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Escherichia*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Escherichia*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Escherichia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

31. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 104, 143, 174 und/oder 193 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Hafnia*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Hafnia*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Hafnia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.



32. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 105, 144, 165, 175 und/oder 187 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß
- es die Gattung *Klebsiella*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Klebsiella*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Klebsiella*,
- unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.
33. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 107, 146, 176 und/oder 194 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß
- es die Gattung *Morganella*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Morganella*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Morganella*,
- unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.
34. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 108, 109, 147, 165, 177, 178, 187 und/oder 188 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß
- es die Gattung *Pantoea*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Pantoea*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Pantoea*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

35. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 110, 111, 148, 149, 179, 180, 195 und/oder 196 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Proteus*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Proteus*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Proteus*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

36. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 121, 122, 152, 153, 164, 184, 185, 199 und/oder 200 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Yersinia*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Yersinia*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Yersinia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

37. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 112, 149, 181 und/oder 197 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß

es die Gattung *Providencia*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Providencia*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Providencia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

38. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 113, 150, 164, 182 und/oder 198 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

es die Gattung *Rahnella*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Rahnella*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Rahnella*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

39. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 202 und/oder 203 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

es die Gattung *Citrobacter*,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Citrobacter*,  
oder beliebige Stämme der Gattung *Citrobacter*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

40. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 204-210, 401, 432 und/oder 486 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakte-

rien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

es die Gattung Salmonella,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Salmonella,  
oder beliebige Stämme der Gattung Salmonella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

41. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 27, 35, 43, 55, 67, 79, 86, 122 und/oder 154 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,  
oder beliebige Gruppen von Gattungen, Arten oder Stämmen aus Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Familie der Moraxellaceae der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Familie der Moraxellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung Acinetobacter,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Acinetobacter,

oder beliebige Stämme der Gattung Acinetobacter,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

42. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 28, 36, 44, 56, 68, 80, 87, 123, 124 und/oder 155 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie
- die "Aeromonas-Gruppe" der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien,
  - oder beliebige Gruppen von Gattungen, Arten oder Stämmen aus der "Aeromonas-Gruppe" der  $\gamma$ -Gruppe,
  - oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der "Aeromonas-Gruppe" der  $\gamma$ -Gruppe,
  - oder die Gattung Aeromonas,
  - oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Aeromonas,
  - oder beliebige Stämme der Gattung Aeromonas,
- unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.
43. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 29, 37, 45, 57, 69, 81, 88, 126 und/oder 156 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie
- die Familie der Pasteurellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,
  - oder beliebige Gruppen von Gattungen, Arten oder Stämmen aus der Familie der Pasteurellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,
  - oder die Gattung Haemophilus,
  - oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Haemophilus,
  - oder beliebige Stämme der Gattung Haemophilus,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

44. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 30, 38, 46, 58, 70, 82, 89, 127 und/oder 157 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gruppen von Gattungen, Arten oder Stämmen aus Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Familie der Moraxellaceae der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Familie der Moraxellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung Moraxella,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Moraxella,

oder beliebige Stämme der Gattung Moraxella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

45. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 31, 39, 47, 59, 71, 83, 128 und/oder 158 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Familie der Pasteurellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Familie der Pasteurellaceae der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung *Pasteurella*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Pasteurella*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Pasteurella*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

46. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 32, 40, 48, 60, 72, 84, 90, 129 und/oder 159 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die *Xanthomonas*-Gruppe der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der *Xanthomonas*-Gruppe der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung *Stenotrophomonas*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Stenotrophomonas*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Stenotrophomonas*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

47. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 33, 41, 50-53, 61-65, 73-77, 91-95, 130-134, 160-162 und/oder 163 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Familie der *Vibrionaceae* der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Familie der *Vibrionaceae* der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung *Vibrio*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Vibrio*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Vibrio*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

48. Verwendung des Nukleinsäuremoleküles SEQ ID 474 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Familie und/oder Mitglieder der Familie der Azotobacteriaceae,

oder die Gattung *Azotobacter*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Azotobacter*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Azotobacter*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

49. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 402, 433, und/oder 487 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Gattung *Buchnera*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Buchnera*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Buchnera*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

50. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 213, 252, 289, 326, 361, 403, 434 und/oder 488 nach Anspruch 1 zum



Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien,

oder die fluoreszierende Gattung *Pseudomonas*

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Pseudomonas*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Pseudomonas*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

51. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 529 nach Anspruch 1 -10 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die *Xanthomonas*-Gruppe der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien,

die Gattung *Xanthomonas*

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Xanthomonas*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Xanthomonas*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

52. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 213, 252, 289, 326, 361, 403, 434 und/oder 488 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien aus dem  $\gamma$ -Zweig der Proteobakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gruppen von Gattungen, Arten oder Stämmen aus Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder beliebige Gattungen, Arten oder Stämme aus der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

oder die Gattung *Pseudomonas*,

oder die Art *Pseudomonas stutzeri*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Pseudomonas* aus der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden der  $\gamma$ -Gruppe,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

53. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 216, 255, 292, 329, 364, 437 und/oder 491 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Rickettsiales,

oder die Familie der Rickettsiaceae

oder die Gattung *Adalia*,

oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung *Adalia*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Adalia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

54. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 215, 254, 291, 328, 363, 436 und/oder 490 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Familie der Rhizobiaceae,  
oder die Gattung Agrobacterium,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Agrobacterium,  
oder beliebige Stämme der Gattung Agrobacterium,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

55. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 439 und/oder 492 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Rhizobiaceae-Gruppe oder Rhizobacteria,  
die Gattung Brucella,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Agrobacterium,  
oder die Art Brucella abortus  
oder beliebige Stämme der Gattung Brucella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

56. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 218, 257, 294, 331, 365, 439 und/oder 492 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Rhizobiaceae-Gruppe oder Rhizobacteria,  
oder die Gattung Brucella,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Agrobacterium,  
oder die Art Brucella ovis  
oder beliebige Stämme der Gattung Brucella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

57. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 439 und/oder 492 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie
- die Rhizobiaceae-Gruppe oder Rhizobacteria,  
oder die Gattung Brucella,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Agrobacterium,  
oder die Art Brucella orientalis  
oder beliebige Stämme der Gattung Brucella,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

58. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 219, 258, 295, 331, 366, 440 und/oder 493 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie
- die Bradyrhizobium-Gruppe,  
oder die Gattung Bradyrhizobium,  
oder beliebige Gruppen von Arten der Gattung Bradyrhizobium,  
oder beliebige Stämme der Gattung Bradyrhizobium,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

59. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 530 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Rickettsiales,  
oder die Familie Rickettsiaceae,  
oder die Ehrlichieae,  
oder die Gattung Cowduria,  
oder beliebige Stämme der Gattung Cowduria,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

60. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 220, 259, 296, 332, 367, 441 und/oder 494 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Zymomonas-Gruppe der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien,  
oder die Gattung Sphingomonas,  
oder die Spezies Pseudomonas paucimobilis,

oder beliebige Stämme der Gattung Sphingomonas oder der Spezies Pseudomonas paucimobilis,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

61. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 221, 260, 297, 333, 368, 442 und/oder 495 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Rhodobacter-Gruppe der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien,  
oder die Gattung Rhodobacter,  
oder beliebige Stämme der Gattung Rhodobacter,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

62. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 222, 261, 298, 333, 369, 443, 496, 497 und/oder 498 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie
- die Rickettsiales,
  - oder die Rickettsiaceae,
  - oder die Rickettsieae,
  - oder die Gattung Rickettsia,
  - oder die Spezies Rickettsia prowazekii oder Rickettsia bellii oder Rickettsia rickettsii,
  - oder beliebige Stämme der Gattung Rickettsia,
- unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.
63. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 223, 262, 299, 334, 370, 405, 499 und/oder 525 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie
- die Zymomonas-Gruppe der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien,
  - oder die Gattung Sphingomonas,
  - oder beliebige Stämme der Gattung Sphingomonas,
- unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

64. Verwendung des Nukleinsäuremoleküls SEQ ID 485 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Rickettsiales,  
oder die Rickettsiaceae,  
oder die Wolbachieae,  
oder die Gattung Wolbachia,  
oder beliebige Stämme der Gattung Wolbachia,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

65. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 224, 263, 300, 335, 371, 500 und/oder 526 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Zymomonas-Gruppe der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien,  
oder die Gattung Zymomonas,  
oder beliebige Stämme der Gattung Zymomonas,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

66. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 225, 264, 301, 336, 372, 406, 501 und/oder 527 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Alcaligenaceae,  
oder die Gattung Alcaligenes,  
oder beliebige Stämme der Gattung Alcaligenes,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

67. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 226, 265, 301, 337, 407, 444 und/oder 502 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Pseudomallei-Gruppe der Pseudomonaden der  $\beta$ -Gruppe der Proteobakterien, oder die Gattung *Pseudomonas* der Pseudomallei-Gruppe,

oder beliebige Stämme der Gattung *Pseudomonas* der Pseudomallei-Gruppe,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

68. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 227, 266, 303, 338, 373, 408, 445 und/oder 503 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

die Burkholderia-Gruppe,

oder die Gattung *Ralstonia*,

oder beliebige Stämme der Gattung *Ralstonia*,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

69. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 228, 267, 304, 339, 374, 409 und/oder 446 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das dadurch gekennzeichnet ist, daß sie



die Campylobacter-Gruppe,  
oder die Gattung Campylobacter,  
oder die Spezies Campylobacter jejuni,  
oder beliebige Stämme der Gattung Campylobacter,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

70. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend eine Sequenz der SEQ ID Nrn. 229, 268, 305, 340, 375, 410, 447 und/oder 504 nach Anspruch 1 zum Nachweis von Bakterien oder phylogenetischen Gruppen von Bakterien, das **dadurch gekennzeichnet** ist, daß sie

die Helicobacter-Gruppe,  
oder die Gattung Helicobacter,  
oder die Spezies Helicobacter pylori,  
oder beliebige Stämme der Gattung Helicobacter,

unter Ausgrenzung von anderen nahe und/oder fern verwandten Bakterien oder Mikroorganismen nachweist.

71. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuremolekül gemäß Alternative a) eine Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nr. 211 und SEQ ID Nr. 212, aufweist.

72. Kombination nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz gemäß Anspruch 71 enthält.

73. Kombination nach Anspruch 72, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 211 und ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 212 enthält.

74. Kit, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 71 und/oder eine Kombination nach Anspruch 72 oder 73.

1/8

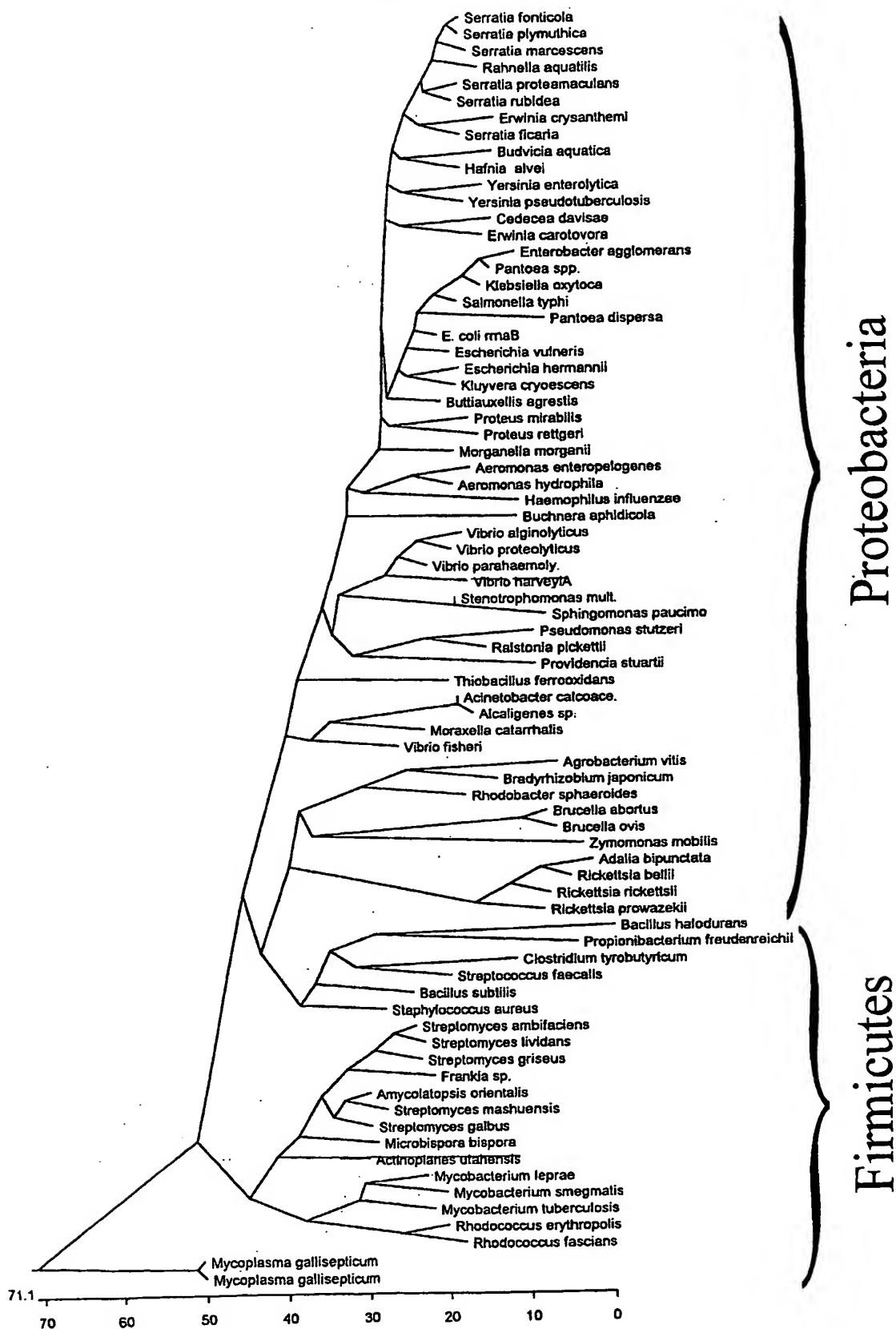


FIG. 1



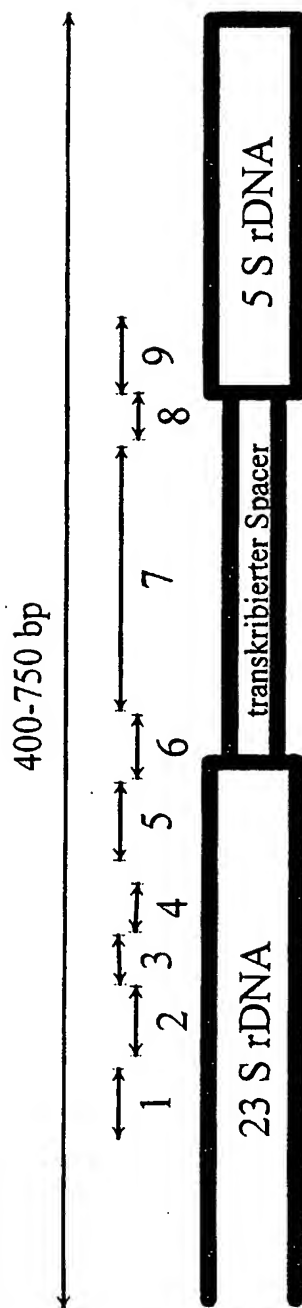


FIG. 2



3/8

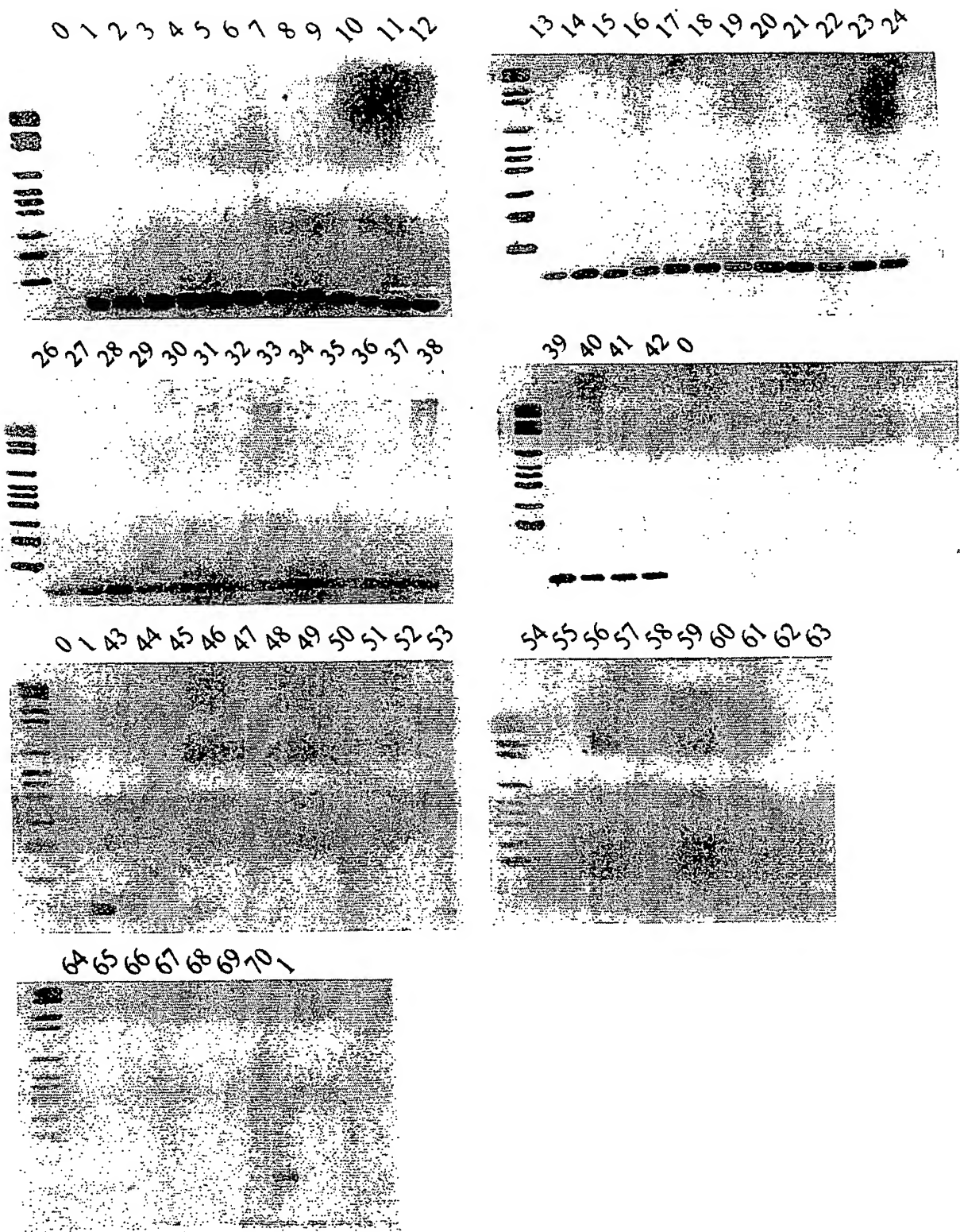


FIG. 3





4/8

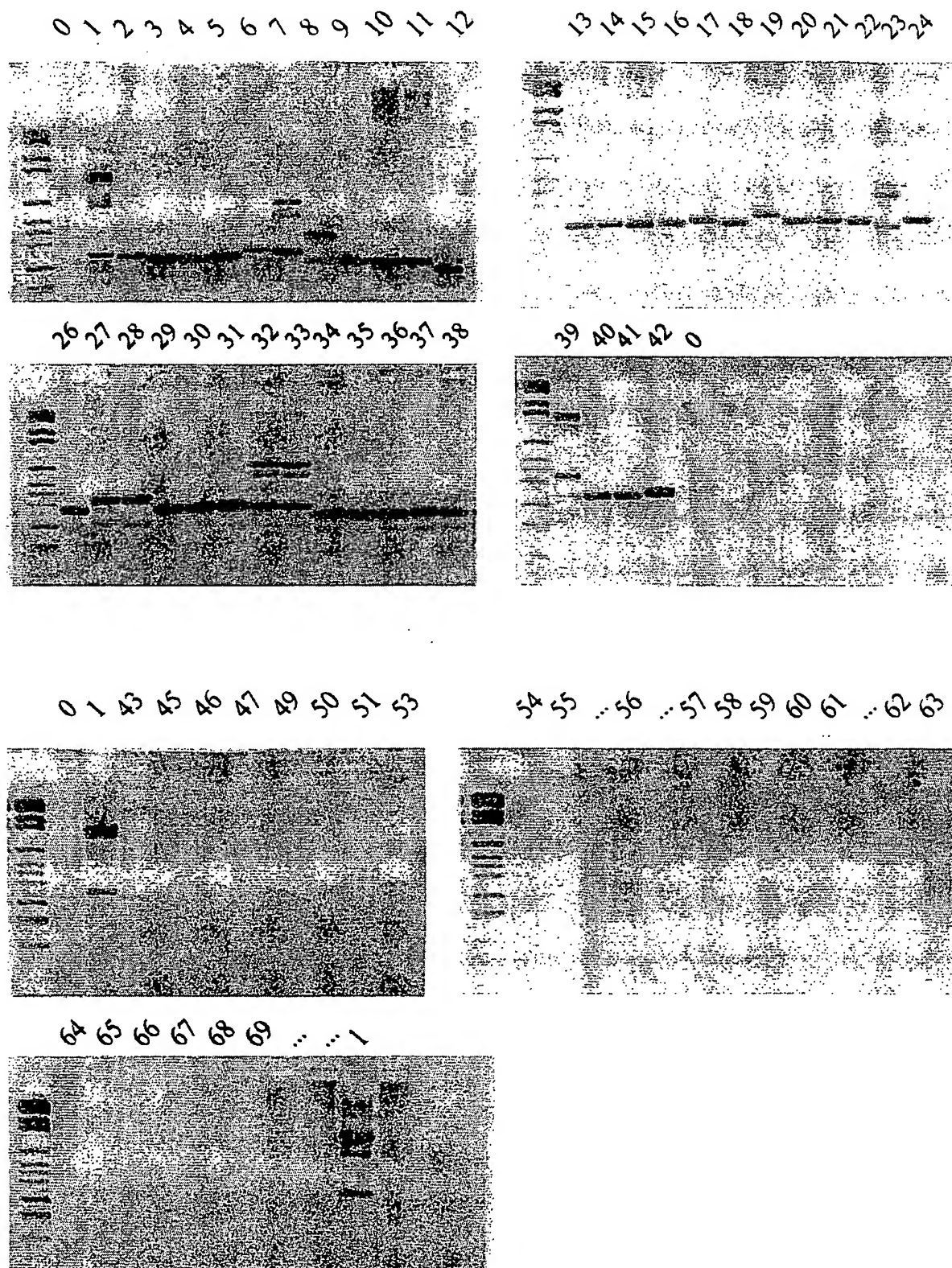


FIG. 4



5/8

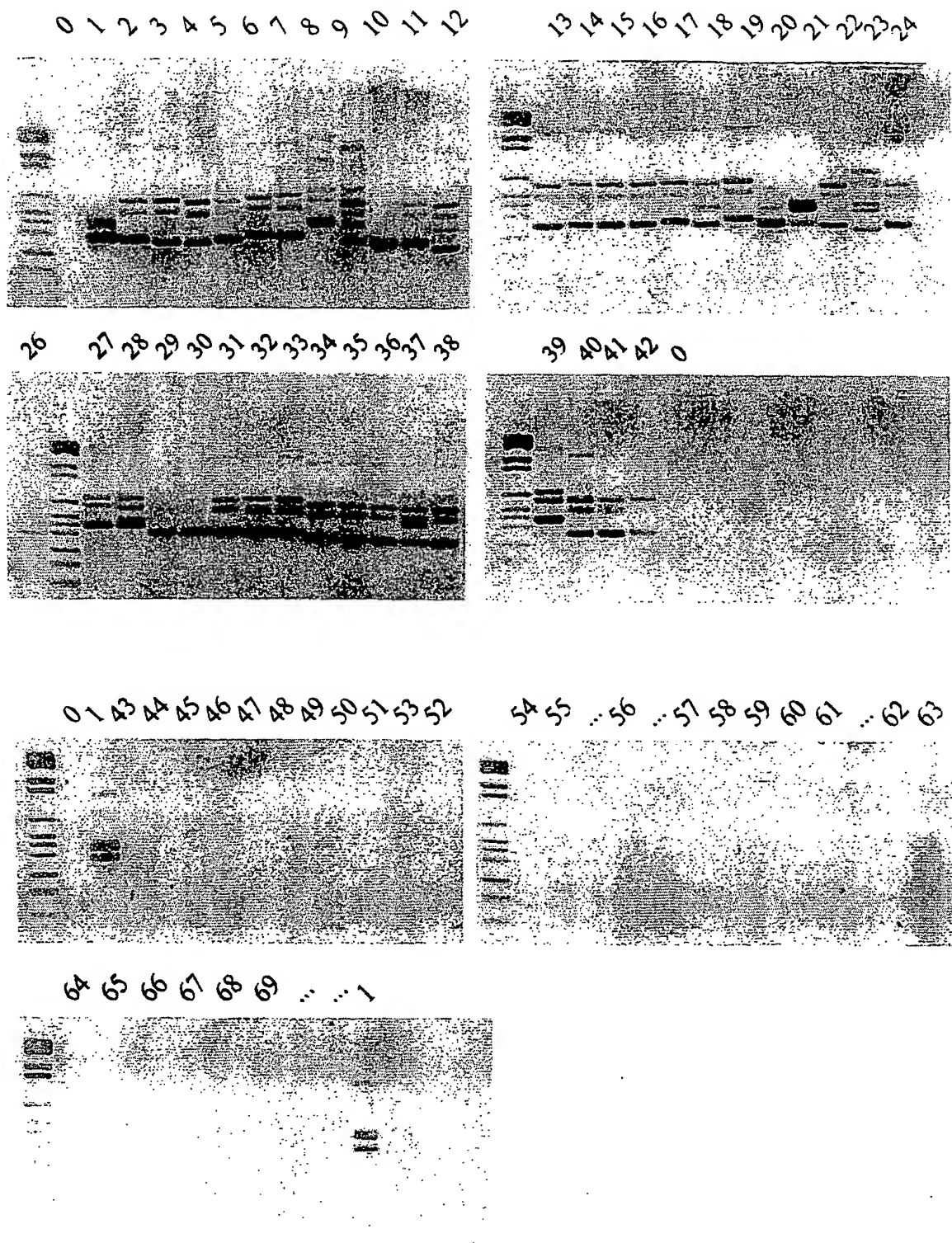


FIG. 5



6/8

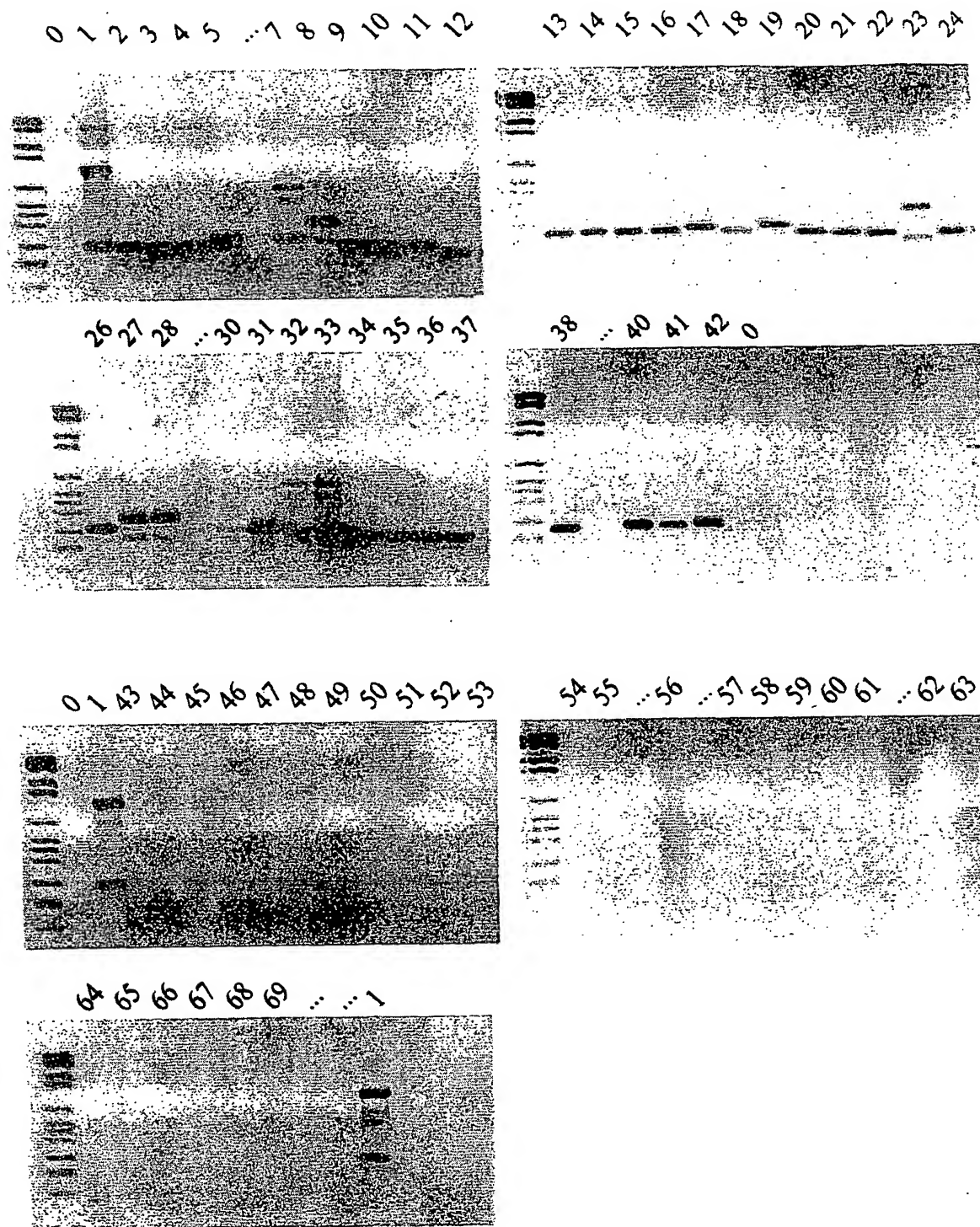


FIG. 6



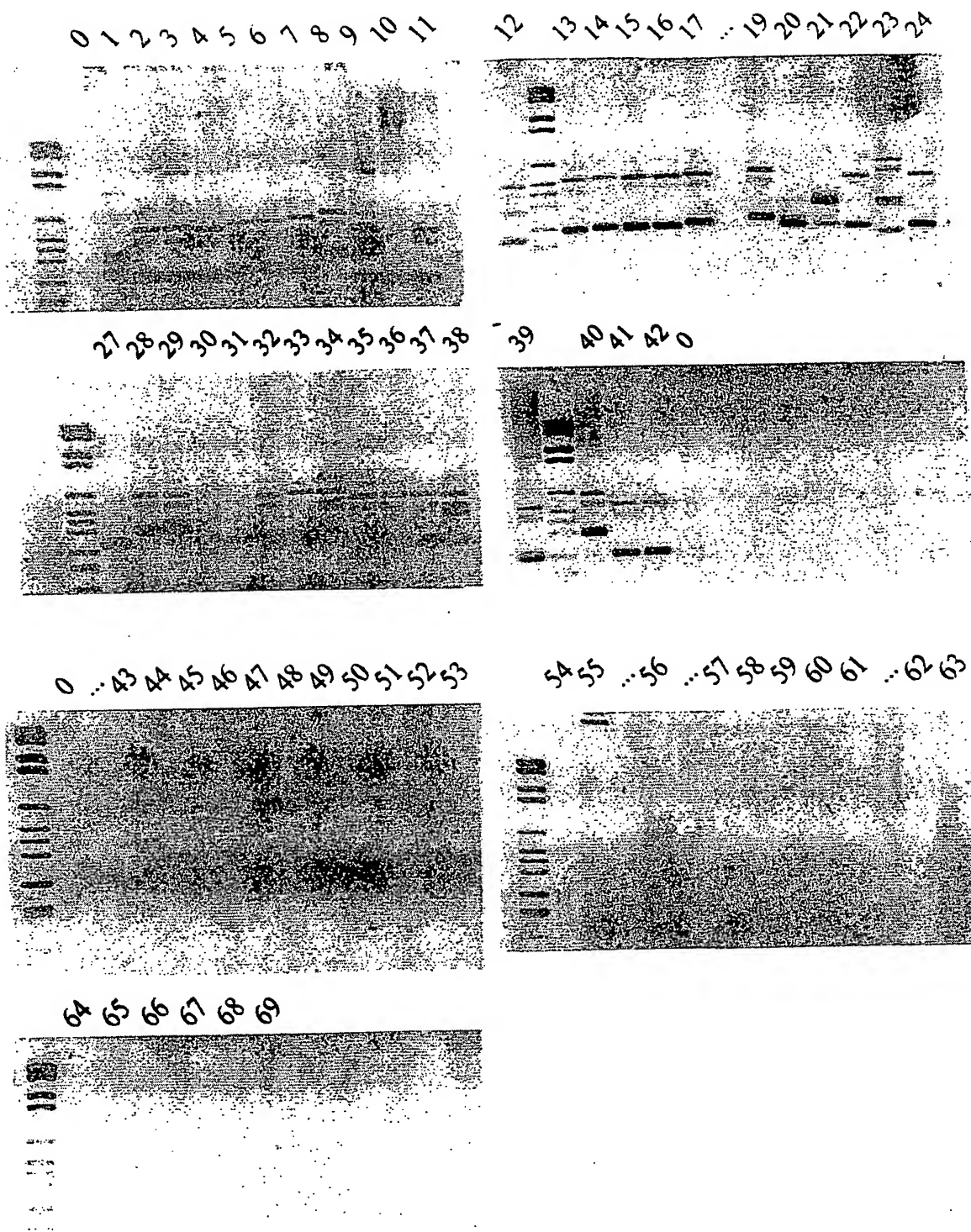


FIG. 7





8/8

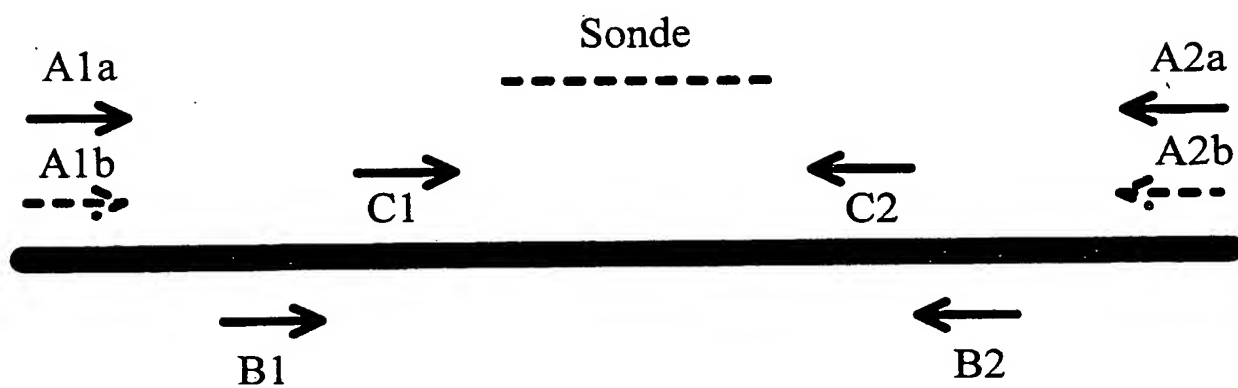


FIG. 8



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BioteCon Diagnostics GmbH

&lt;120&gt; Nukleinsäuremoleküle zum Nachweis von Bakterien und phylogenetischen Einheiten von Bakterien

&lt;130&gt; PCT1217-066

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 530

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3118

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 1

```

ggttaagcga ctaagcgtac acggtggatg ccctggcagt cagaggcgat gaaggacgtg 60
ctaactctgcg ataagcgtcg gtaagggtgat atgaaccgtt ataaccggcg atttccgaat 120
ggggaaaccc agtgtgtttc gacacactat cattaactga atccataggt taatgaggcg 180
aaccggggga actgaaacat ctaagtaccc cgaggaaaag aaatcaaccg agattccccc 240
agtagcggcg agcgaacggg gagcagccca gagcctgaat cagtgtgtgt gttagtggaa 300
gcgtctggaa aggcgtgcga tacagggtga cagccccgta cacaaaaatg cacatgctgt 360
gagctcgatg agtagggcgg gacacgtggt atcctgtctg aatatggggg gaccatcctc 420
caaggctaaa tactcctgac tgaccgatag tgaaccagta ccgtgagggg aaggcgaaaa 480
gaaccccggc gaggggagtg aaaaagaacc tgaaccgtg tacgtacaag cagtgggagc 540
acgcttaggc gtgtgactgc gtaccttttg tataatgggt cagcgactta tattctgtag 600
caagggttaac cgaatagggg agccgaaggg aaaccgagtc ttaactgggc gttaagtgtc 660
agggatataga cccgaaaccc ggtgatctag ccattggcag gttgaagggt gggtaacact 720
aactggagga ccgaaccgac taatgttgaa aaattagcgg atgacttgtg gctgggggtg 780
aaaggccaat caaacgggga gatagctggt tctccccgaa agctatttag gttagcgcctc 840
gtgaattcat ctccgggggt agagcactgt ttccggcaagg gggtcacccc gacttaccaa 900
cccgatgcaa actgcgaata ccggagaatg ttatcacggg agacacacgg cgggtgctaa 960
cgtccgtcgt gaagagggaa acaaccacga ccgccagcta aggtcccaaa gtcattggtta 1020
agtgggaaac gatgtgggaa ggcccagaca gccaggatgt tggcttagaa gcagccatca 1080
tttaaagaaa gcgtaatagc tcactggtcg agtcggcctg cgcggaagat gtaacggggc 1140
taaaccatgc accgaagctg cggcagcgac actatgtgtt gttgggtagg ggagcgttct 1200
gtaagcctgt gaagggtgtg tgtgaggcat gctggaggta tcagaagtgc gaatgctgac 1260
ataagtaacg ataaagcggg tgaagagccc gctcgccgga agaccaaggg ttctgttcca 1320
acgttaatcg gggcagggtg agtcgacccc taaggcgagg ccgaaaggcg tagtcgatgg 1380
gaaacagggt aatattcctg tacttgggtg tactgcgaag gggggacgga gaaggctatg 1440
ttggccgggc gacggttgtc ccggtttaag cgtgtaggct ggttttccag gcaaaccgg 1500
aaaatcaagg ctgaggcgtg atgacgaggc actacggtgc tgaagcaaca atgcccctgc 1560
ttccaggaaa agcctctaag catcaggtaa catcaaactc taccctaaac cgacacaggt 1620
ggtcaggtag agaataccaa ggcgtttgag agaactcggg tgaagggaact aggcaaaatg 1680
gtgccgtaac ttccgggagaa ggcacgctga tatgtagggt aagcgacttg ctctgggagc 1740
tgaaatcagt cgaagatacc agctggctgc aactgtttat taaaaacaca gcactgtgca 1800
aacacgaaag tggacgtata cgggtgtgac cctgcccggg gccggaagggt taattgatgg 1860
ggtttagccg aaggcgaagc tcttgatcga agccccgga aacggcggcc gtaactataa 1920
cggtcctaag gtagcgaat tccttgctcg gtaagtccg acctgcacga atggcgtaat 1980
gatggccagg ctgtctccac ccgagactca gtgaaattga actcgctgtg aagatgcagt 2040
gtaccccgcg caagacggaa agaccccgtg aacctttact atagcttgac actgaacatt 2100
gagccttgat gtgtaggata ggtgggaggc tttgaagtgt ggacgccagt ctgcatggag 2160
ccgaccttga aataccaccc tttaatgttt gatgttctaa cgttgacccg taatccgggt 2220
tgcggacagt gctctgtggg tagtttgact ggggcggtct cctcctaaag agtaacggag 2280
gagcacgaag tttggctaag cctggtcgga catcaggagg ttagtgcaat ggcataagcc 2340
agcttgactg cgagcgtgac ggcgcgagca ggtgcgaaag caggtcatag tgatccgggtg 2400
gttctgaatg gaagggccat cgctcaacgg ataaaaggta ctccggggat aacaggctga 2460
taccgcccaa gagttcatat cgacggcggt gtttggcacc tcgatgtcgg ctcatcacat 2520

```



```

cctggggctg aagtaggtcc caagggtatg gctgttcgcc atttaaagtg gtacgcgagc 2580
tgggtttaga acgtcgtgag acagttcggc ccctatctgc cgtgggcgct ggagaactga 2640
ggggggctgc tcctagtacg agaggaccgg agtgagcgca tcactggtgt tcgggttgtc 2700
atgccaatgg cactgcccgg tagctaaatg cggaagagat aagtgtctgaa agcatctaag 2760
cacgaaactt gccccgagat gagttctccc tgactccttg agagtcctga aggaacggtg 2820
aagacgacga cgttgatagg ccgggtgtgt aagcgcagcg atgcgttgag ctaaccggtg 2880
ctaataaacc gtgaggctta acctacaac gccgaagggtg ttttggcgga ttgagagaag 2940
attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg 3000
cctggcgcca gtagcgcggg ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc 3060
cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctcct catgcgagag tagggaactg ccaggcat 3118

```

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
 von Gattungen der Enterobakterien

<400> 2  
 ttcgggttgt catgccaatg 20

<210> 3  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
 von Gattungen der Enterobakterien

<400> 3  
 ctgaaagcat ctaagcgcgga aacttg 26

<210> 4  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
 von Gattungen der Enterobakterien

<400> 4  
 ctgaaagcat ctaagcggga aacttg 26

<210> 5  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
 von Gattungen der Enterobakterien

<400> 5  
 ctgaaagcat ctaagcacga aacttg 26

<210> 6



<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 6  
ctgaaagcat ctaagcagga aacttg 26

<210> 7  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 7  
gggaggactc atctcgaggc aagtt 25

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 8  
gggaggactc atctcggggc aagtt 25

<210> 9  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 9  
gggaggactc atctcaaggc aagtt 25

<210> 10  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 10  
gggaggactc atctcagggc aagtt 25

<210> 11





<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 11  
gggaggactc atcttgaggc aagtt 25

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 12  
gggaggactc atcttggggc aagtt 25

<210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 13  
gggaggactc atcttaaggc aagtt 25

<210> 14  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 14  
gggaggactc atcttagggc aagtt 25

<210> 15  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 15  
gggagaactc atctcgaggc aagtt 25

<210> 16



<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 16  
gggagaactc atctcggggc aagtt 25

<210> 17  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 17  
gggagaactc atctcaagc aagtt 25

<210> 18  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 18  
gggagaactc atctcagggc aagtt 25

<210> 19  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 19  
gggagaactc atcttgaggc aagtt 25

<210> 20  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 20  
gggagaactc atcttggggc aagtt 25

<210> 21



<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 21  
gggagaactc atcttaagc aagtt

25

<210> 22  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 22  
gggagaactc atcttagggc aagtt

25

<210> 23  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 23  
ccgccaggca aattcggt

18

<210> 24  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 24  
tcaggtggga ccaccgc

17

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 25  
ccgccaggca aattctgt

18

<210> 26



<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Enterobakterien

<400> 26  
ccggagtgga cgcaccactg gtgttcgggt tgtcatgcca atggcattgc ccgg 54

<210> 27  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung Acinetobacter

<400> 27  
ccagagtgga cgaacctctg gtgtaccggt tgtgacgcca gtcgcatcgc cggg 54

<210> 28  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Aeromonas

<400> 28  
ccggagtga cgaacctctg gtgttcgggt tgtcacgcca gtggcactgc ccgg 54

<210> 29  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Haemophilus

<400> 29  
ccggagtgga cgcattcactg gtgttcgggt tgtgtcgcca gacgcattgc cggg 54

<210> 30  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 30  
ccggagtgga cgcattcactg gtgttcgggt tgtgtcgcca gacgcattgc cggg 54

<210> 31





<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Pasteurella

<400> 31  
ccgggatgga cacaccgctg gtgtaccagt tgttctgccca agagcatcgc tggg 54

<210> 32  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der  
Gattung Stenotrophomonas

<400> 32  
ccggagtgga cgaacctctg gtgtaccggt tgtcacgccca gtggcattgc cggg 54

<210> 33  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattungt Vibrio

<400> 33  
ccggagtgga cgaacctctg gtgttcgggt tgtgtcgcca gacgcattgc ccgg 54

<210> 34  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 34  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacttcctc g 41

<210> 35  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung Acinetobacter

<400> 35  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctacctc a 41



<210> 36  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Aeromonas

<400> 36  
tcgataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcgagccct g

41

<210> 37  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Haemophilus

<400> 37  
gagataagtg ctgaaagcat ctaagcacga aacttgccaa g

41

<210> 38  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 38  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcccacctt aa

42

<210> 39  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Pasteurella

<400> 39  
gggataagtg ctgaaagcat ctaagcacga agccccctc aa

42

<210> 40  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung  
Stenotrophomonas

<400> 40  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacttgcctt ga

42



<210> 41  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung *Vibrio*

<400> 41  
tcgataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcgagcctt ga 42

<210> 42  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 42  
agatgagtct tccctgggcc ttta 24

<210> 43  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Acinetobacter*

<400> 43  
agataagatt tccctaggac ttta 24

<210> 44  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Aeromonas*

<400> 44  
agatgagtca tccctgaccc cttg 24

<210> 45  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Haemophilus*

<400> 45  
agatgagtca tccctgactt t 21



<210> 46  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 46  
agataagatt tcc 13

<210> 47  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Pasteurella

<400> 47  
agatgagatt tcccattacg c 21

<210> 48  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung  
Stenotrophomonas

<400> 48  
agatgagatt tcccggagcc ttg 23

<210> 49  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Vibrio alginolyticus

<400> 49  
agatgagttc tccctgatac ttta 24

<210> 50  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Vibrio fisheri

<400> 50  
agattagatt tcc 13

<210> 51  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Vibrio harbeyi

<400> 51





agatgagtct tccctgggcc ttta

24

<210> 52  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Vibrio parahaemolyticus*

<400> 52  
agatgagtct tccctgatac ttta

24

<210> 53  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Vibrio proteolyticus*

<400> 53  
agatgagtct tccctggcac ttta

24

<210> 54  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 54  
agggtcctga agggacgttg aagactacga cg

32

<210> 55  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Acinetobacter*

<400> 55  
tgtcctctaa agagccgttc gagactagga cg

32

<210> 56  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Aeromonas*

<400> 56  
tgtcctctaa agagccgttc gagactagga cg

32

<210> 57  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz



<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Haemophilus

<400> 57  
aagtcagtaa gggttgttgt agactacgac g 31

<210> 58  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 58  
ctaaagagcc gttgtagacg acgacg 26

<210> 59  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Pasteurella

<400> 59  
aagtaagtaa gatccctcaa agacgatgag g 31

<210> 60  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung  
Stenotrophomonas

<400> 60  
agctccttga agggtcgttc gagaccagga cg 32

<210> 61  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Vibrio alginolyticus

<400> 61  
agtatcctaa agggttgtcg tagmtacgac gt 32

<210> 62  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Vibrio fisheri

<400> 62  
ctaaagagcc gttcaagact aggacgt 27



<210> 63  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Vibrio harbeyi*

<400> 63  
agtatcctaa agggttgttc gagactagaa cgt 33

<210> 64  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Vibrio parahaemolyticus*

<400> 64  
agtatcctaa agggttgttc gagactagaa cgt 33

<210> 65  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Vibrio proteolyticus*

<400> 65  
agtgtcctga agggttgttc gagactagaa cgt 33

<210> 66  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 66  
agcgatgcgt tgagctaacc agtactaatg acccgtgagg 40

<210> 67  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Acinetobacter*

<400> 67  
agtgatatgt gaagctgacc aatactaatt gctcgtgagg 40

<210> 68  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Aeromonas*

<400> 68  
ggcgacgtgt tgagctaacc catactaatt acccgtgagg 40



<210> 69  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Haemophilus

<400> 69  
tgtgagtcacat tgagctaacc aataactaatt gcccgcagagg 40

<210> 70  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 70  
agtgcatacat gtagctaacc aataactaatt gctcggttgg 40

<210> 71  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Pasteurella pneumotropica

<400> 71  
tgccgcacacg tgcagctgac gaataactaat cgatcgagga cttaacc 47

<210> 72  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung  
Stenotrophomonas

<400> 72  
agtaatgcat taagctaacc agtactaatt gcccgtacgg 40

<210> 73  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Vibrio alginolyticus

<400> 73  
tgtgaggcgt tgagctaacc tgtactaatt gcccgtgagg 40

<210> 74  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Vibrio fisheri





<400> 74  
agtgatgcgt gtagctaacc tgtactaatt gctcgtttgg 40

<210> 75  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Vibrio harveyi*

<400> 75  
tgtgaggcgt tgagctaacc tgtactaatt gcccgtagg 40

<210> 76  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Vibrio paramaemolyticus*

<400> 76  
tgtgaggcat tgagctaact gatactaatt gcccgtagg 40

<210> 77  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Vibrio proteolyticus*

<400> 77  
tgtgaggcgt tgagctaacc tgtactaatt gcccgtagg 40

<210> 78  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 78  
acccgtagg cttaacctta caacaccgaa 30

<210> 79  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Acinetobacter*

<400> 79  
gctcgtgagg cttgactata caacacccaa 30

<210> 80  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Aeromonas*



<400> 80  
accctgtgagg cttaaccata caacacccaa 30

<210> 81  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Haemophilus

<400> 81  
gcccgagagg cttaactata caacgctcaa 30

<210> 82  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:abgeleitet  
von von Arten der Gattung Moraxella

<400> 82  
gctcgtttgg cttgaccata caacacccaa 30

<210> 83  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Pasteurella pneumotropica

<400> 83  
gctgacgaat actaatcgat cgaggactta acc 33

<210> 84  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Stenotrophomonas

<400> 84  
gcccgtaggg cttgtcccta taaccttggg 30

<210> 85  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 85  
caacaccgaa ggtgttttgg aggaatc 27

4

5

6

7

8

9

<210> 86  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 86  
caacacccaa gcagttgtat ataaagc 27

<210> 87  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von von Arten der Gattung *Aeromonas*

<400> 87  
caacacccaa gaagtgttct aaggctt 27

<210> 88  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 88  
caacgctcaa gtgttttttg gagctaa 27

<210> 89  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 89  
caacacccaa gtggttttacc actgact 27

<210> 90  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
abgeleitetet von Arten der Gattung  
*Stenotrophomonas*

<400> 90  
taaccttggt agtccaaggt cgagtac 27

<210> 91  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Vibrio alginolyticus*

<400> 91  
caacacccaa ggggttttga tggactc 27

<210> 92



<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> *Vibrio fisheri*

<400> 92  
 caacacccaa gtggtttgta tcaagca 27

<210> 93  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> *Vibrio harveyi*

<400> 93  
 caacacccaa ggggttttga tggactc 27

<210> 94  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> *Vibrio paramaemolyticus*

<400> 94  
 caacacccaa ggggttttga tggactc 27

<210> 95  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> *Vibrio proteolyticus*

<400> 95  
 caacacccaa ggggttttga tggactcaat gaaaga 36

<210> 96  
 <211> 118  
 <212> DNA  
 <213> *Budvicia aquatica*

<400> 96  
 caacatccga ggtgttttaa ggaaagtga agagacgaaa gaataagtag aattccagct 60  
 tgaaccgaga ttgagttgat ggttgtgtga atgacacgac ggtcaataga cagaatat 118

<210> 97  
 <211> 111  
 <212> DNA  
 <213> *Buttiauxella agrestis*

<400> 97  
 caacaccgaa ggtgttttgg ttgagagact aagatattga attttcagct tgaaccgaga 60  
 ttttaagtcg atggttgtgt gaacagcatg acggttgatg aaacagaata t 111

<210> 98  
 <211> 193  
 <212> DNA  
 <213> *Enterobacter agglomerans*

<400> 98  
 caacgcggaa gatgttttgg cggattgaga agattttcag cattgattac agattttcgg 60  
 gaacgaaaga ttttacgctg aggcaaggcg gcaaatgaag taaaggaagg agcatacatg 120  
 agtatgtgac tgacttttgcg aatgcagcca acgcagccac agtgaaaaag attcgtttct 180  
 ggcaacagaa ttt 193





<210> 99  
<211> 123  
<212> DNA  
<213> *Erwinia carotovora*

<400> 99  
caacaccgaa ggtgttttga gagtgactca aagagatggt gataatcagc ttgttttagg 60  
attggttctg atggttatgc gagagcgaaa gcgaagcatg acggttgga tgaaacagaa 120  
ttt 123

<210> 100  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> *Erwinia chrysanthemi*

<400> 100  
caacaccgaa ggtgttttag agagattggt ttgaattttc agtgaagttc cgagattggt 60  
tctgatggct acggagtagc ggtcgggatg aaacaaaatt t 101

<210> 101  
<211> 92  
<212> DNA  
<213> *Escherichia coli*

<400> 101  
caacgccgaa gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgatata gattaaatca 60  
gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat tt 92

<210> 102  
<211> 104  
<212> DNA  
<213> *Escherichia hermannii*

<400> 102  
caacgccaga gtggttttgg tggtgcggtg tgagagacga ttttcagctt gaccggatag 60  
acatctgtgg cggcgcgaga gcacgcagca ggtgaacaga attt 104

<210> 103  
<211> 92  
<212> DNA  
<213> *Escherichia vulneris*

<400> 103  
caacgccgaa gatgttttgg cggatttgaa agacgatttt cagctgatac agattaagtc 60  
tgccgcctga cggcgtcaga cagacagaat tt 92

<210> 104  
<211> 119  
<212> DNA  
<213> *Hafnia alvei*

<400> 104  
caacaccgaa ggtgttttta gacgcagaga cgcgaaaaca caaagagtaa gcttggtgaa 60  
cagattggtt tgtatggcta gctgtagaaa tacagaaaagc ggtacaaata acagaatat 119

<210> 105  
<211> 195



&lt;212&gt; DNA

<213> *Klebsiella oxytoca*

&lt;400&gt; 105

```
cgccgaagat gttttggcga tttgagaaga caacaatttc agcattgatt acagattttc 60
gggaacgaaa gatttttacgc tgaggcaagg cggc aaatga aggaaaggaa ggagcatact 120
gaagtatgtg actgacttta cgaatgcagc caacgcagca tcggtgtaaa agattcgttt 180
ctgacaacag aattt 195
```

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 90

&lt;212&gt; DNA

<213> *Kluyvera cryoescens*

&lt;400&gt; 106

```
cgccaaagat gttttggtga aaagagacat caataatcag cttgatacag ataaattaac 60
tggccgaaag gcgggttaat aacagaattt 90
```

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 105

&lt;212&gt; DNA

<213> *Morganella morganii*

&lt;400&gt; 107

```
caccgaaggt gttttgagtt gagagacgat taaagagatt tttcagcaca gtgaagaggc 60
agaagtcatt cactgtgaaa gcttattttg gattgaaatg aattt 105
```

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 192

&lt;212&gt; DNA

<213> *Pantoea dispersa*

&lt;400&gt; 108

```
cgccgagaggc gttttggtct gagagaccna aagaattttc agcattgttc accggattac 60
ntccagtgga ttttgtgctg tgacaaggcg gcacgcgaga cgacgggaag gagcatacac 120
gagtatgtga ctgagcggcg cgagcggggc aacgcagtcg gagcgcaaaa gacgcggtnt 180
aaaacaaaat tt 192
```

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 190

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Pantoea*

&lt;400&gt; 109

```
cgccgaagat gttttggcgg aatgagaaga ttttcagcat tgattacaga ttttcgggaa 60
cgaaagattt tacgctgagg caaggcggca aatgaagtaa aggaaggagc atacatgagt 120
atgtgactga ctttkcggat gcagccaacg cagccacagt gaaaaagatt cgtttctggc 180
aacagaattt 190
```

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; DNA

<213> *Proteus mirabilis*

&lt;400&gt; 110

```
caacaccgaa agtggtttgt cagagagacg aaacgatgaa gtcagcttgt tcaanattga 60
```



attactggcg acttaccgaa aggaaagaag cgagtgatta aaaccgaatt t 111

<210> 111  
<211> 139  
<212> DNA  
<213> *Proteus rettgeri*

<400> 111  
caacaccgaa ggtgttttag agagatagag ttgttttcaa gaaagagtga gaagccaaaa 60  
ggtgaaggac acgcagcttg tttgagattg aggttctggt ttagtgaaga aaaactaaa 120  
cggaacaaaa acagaattt 139

<210> 112  
<211> 137  
<212> DNA  
<213> *Providencia stuartii*

<400> 112  
caacaccgaa ggtgttttag agagacgaag agacgaattg ttgaagcgca cgagatagag 60  
tggtgcgaaa aaatcagctt gttcaagatt gcagttctgg tttgcggtgt agacgcgaac 120  
gggaacgaac cgaattt 137

<210> 113  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 113  
caacaccgaa ggtgtttttg atttgagaga cagactcgag agagtagatt ttcagcgaat 60  
tggtccggtg ttggttcgta tggcggcgtg tgatgagaaa ttatgacacg acgcggtatg 120  
aatgaaacag aattt 135

<210> 114  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> *Serratia ficaria*

<400> 114  
caacaccgaa ggtgttttag agagacgaat aattttcagc gaagttctta gattggttct 60  
ggtggttacg cgagtaacgg ccaagaatga aacagaattt 100

<210> 115  
<211> 106  
<212> DNA  
<213> *Serratia fonticola*

<400> 115  
caacacccaa ggtgttttga agagattgaa gtagattttc agcgaagttc cgagattggt 60  
ttcaatggcg acacgagagt gaagcgggtg aaatgaaaca gaattt 106

<210> 116  
<211> 97  
<212> DNA  
<213> *Serratia marcescens*

<400> 116  
caacaccgaa ggtgttttta gagagatttt cagcgaagtt ccgagattgg ttctgatggc 60  
gacacgaaag tgaagcgggt ggaatgaaac agaattt 97



<210> 117  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> *Serratia plymuthica*

<400> 117  
caacaccgaa ggtgttttag agagattaca gtagattttc agcgacgttc cgagattggt 60  
ttcaatggcc caaaaggcgg ttggaatgaa acagaattt 99

<210> 118  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> *Serratia proteamaculans*

<400> 118  
caacaccaaa ggtgttttag agagattgta gagattttca gcgagttccg agattgggtt 60  
caatggctgc gagagtagcg gttggaatga aacanaattt 100

<210> 119  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> *Serratia rubidea*

<400> 119  
caacaccgaa ggtgttttag agagattggt ttgaattttc agtgaagttc cgagattggt 60  
tctgatggct acggagtagc ggtcgggatg aaacagaatt t 101

<210> 120  
<211> 116  
<212> DNA  
<213> *Yersinia enterolytica*

<400> 120  
caacaccaaa ggtgttttgt atttgagaga tagatattga ttttcagcga atgttccgag 60  
attgggctgg ctggctgtgt gaaagattgc atagcgggtt agtttagaca gaattt 116

<210> 121  
<211> 104  
<212> DNA  
<213> *Yersinia pseudotuberculosis*

<400> 121  
caacaccgaa gtcttgaatt gagagagatt ttcagcgtcg ttccgagatt ggattgactg 60  
gcgtcacaag cgctgtttgt gtgcgggtta attaaaacag attt 104

<210> 122  
<211> 179  
<212> DNA  
<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 122  
caacacccaa gcagttgtat ataaagcatc aatcgattca ttaatatgca aagcaacttg 60  
atttagttat acgcttagct aaaatgaaca aaatatagta agactcaatc agcccatctg 120  
taaagatttg gaaaacgcat cggcaaccaa taagaccaat gcaagtatcc ataccagtt 179

<210> 123  
<211> 118  
<212> DNA





<213> *Aeromonas enteropelogenes*

<400> 123

caacacccaa gaagtgtttn tgggtgcttgt agcgaatgaa cgaactacgc attcagtgat 60  
aacgacaagc cacgagcaac atcgttattc acgtcagctt tccaagattg aagatttt 118

<210> 124

<211> 81

<212> DNA

<213> *Aeromonas hydrophila*

<400> 124

caacacccaa gaagtgttct aaggcttgta gcagataccg agaacgaaca acaaaatcag 60  
ctttctcaga ttgaagaatt t 81

<210> 125

<211> 96

<212> DNA

<213> *Cedecea davisae*

<400> 125

caacacccaaa ggtgttttgc gagacgcaat tttaattttc agcgaagttc aggattagac 60  
tgatggtcac aaagtgcgg tcagtaaaca gaattt 96

<210> 126

<211> 217

<212> DNA

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 126

caacgctcaa gtgttttttg gagctaagtg aagtaagaga tgaaaagcga agcaaataaa 60  
agcagagcga aagagaagta aaagactaaa caaagaaaag taaatataga agacttaata 120  
gaaagaaaat cggattcagc ttgtgaccaa taagaacgag tgaaaggtag aggaaagact 180  
gagtaacgag agataaaaaga gacgagagat aaaagag 217

<210> 127

<211> 90

<212> DNA

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 127

caacacccaa gtggtttacc actgactgtg ttgattggta atatataaga tgaaccttaa 60  
tcttgatttg gtaataaaca gactcataca 90

<210> 128

<211> 134

<212> DNA

<213> *Pasteurella pneumotropica*

<400> 128

cgaggactta accaaatttg tttatcgtaa caatgtcggt tatccagttt tgaaagaata 60  
aatttttatt aaataactct tgcattattc tacagagttg ttataataaa acatgtcctt 120  
caaaagtatt caag 134

<210> 129

<211> 141

<212> DNA

<213> *Stenotrophomonas multophila*



&lt;400&gt; 129

taaccttggt agtccaaggt cgagtacaac tgctcgatac aaaagctaca acccnaetta 60  
cttcttccag attcatggcc acgctgaaca aagcgtaggg tgggcggctg tnccgcccac 120  
gcgtaactca agcgtagcca g 141

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio alginolyticus*

&lt;400&gt; 130

caacacccaa ggggttttga tggactcaat gaaagaacat tgaatgtgta agaacgagaa 60  
ttaaaaaaca gctttccaga ttaaagaatt tgcttgcgga 100

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio fisheri*

&lt;400&gt; 131

caacacccaa gtgggtttgta tcaagcatta tatcgatata accgttatcc ttgattcagt 60  
taggataagt gatacttaag tcattaagta aaacaaacac agactcatat ctaaccccct 120  
tt 122

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio harveyi*

&lt;400&gt; 132

caacacccaa gtgggtttgta tcaagcatta tatcgatata accgttatcc ttgattcagt 60  
taggataagt gatacttaag tcattaagta aaacaaacac agactcatat ctaaccccct 120  
tt 122

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio paramaemolyticus*

&lt;400&gt; 133

caacacccaa ggggttttga tggactcgaa gcaagaacag aattgaatgt gtagagaaca 60  
caaaaacagc tttccgaatt aaagaattt 89

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 169

&lt;212&gt; DNA

<213> *Vibrio proteolyticus*

&lt;400&gt; 134

caacacccaa ggggttttga tggactcaat gaaagaacat tgaatgtgta agaacgagaa 60  
ttaaaaaaca gctttccgaa tttaggaatt gaatttatta acgacatcca tgctgttaac 120  
ccttcgggcc gactgaagt gcgttaaatt ttgttccaga caaaatttt 169

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;



<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitetet  
von Gattungen der Enterobakterien

<400> 135  
gcctggcggc actagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 136  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Buttiauxella agrestis

<400> 136  
gcctggcggc agtagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 137  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Enterobacter agglomerans

<400> 137  
gcctggcggc ttttagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 138  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Erwinia carotovora

<400> 138  
gcctggcggc gatagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 139  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Erwinia chrysanthemi

<400> 139  
gcctggcggc ggtagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 140  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 140  
gcctggcggc agtagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 141  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Escherichia hermannii

<400> 141  
gcctggcggc aagagcgcgg tgggtcccacc tga 33

<210> 142  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Escherichia vulneris



<400> 142  
gcctggcggc actagcgcgg tggteccacc tga 33

<210> 143  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Hafnia alvei

<400> 143  
gcctggcggc gatagcgcgg tggteccacc tga 33

<210> 144  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Klebsiella oxytoca

<400> 144  
gcctggcggc actagcgcgg tggteccacct ga 32

<210> 145  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Kluyvera cryoescens

<400> 145  
gcctggcggc aacagcgcgg tggteccacc tga 33

<210> 146  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Morganella morganii

<400> 146  
gcctggcggc cgtagcgcgg tggteccacc tga 33

<210> 147  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Pantoea dispersa

<400> 147  
gcctggcggc aacagccgcg gtggteccac c 31

<210> 148  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Proteus mirabilis

<400> 148  
gcttggtggc catagcgcgg tggteccacc tga 33

<210> 149  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>





<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen *Proteus*, *Providencia*

<400> 149  
gtctggcggc aatagcacgg tggccccacc tga 33

<210> 150  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 150  
gcctggcggc agtagcgcgg tggccccacc tga 33

<210> 151  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Serratia*

<400> 151  
gcctggcggc aatagcgcgg tggccccacc tga 33

<210> 152  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Yersinia enterocolytica*

<400> 152  
gcctggcggc catagcgcgg tggacccacc tga 33

<210> 153  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Yersinia pseudotuberculosis*

<400> 153  
gtctggcggc catagcgcgg tggcycacc tga 33

<210> 154  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 154  
aagtatccat accagttgtg ctggcgacca tagcaagagt gaaccacctg a 51

<210> 155  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Aeromonas*



<400> 155  
gcctggcggc catagcgccg tggaaccacc tga 33

<210> 156  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Haemophilus influenzae

<400> 156  
aaaagacgag ttatcaaaga attatcctgg cggcgatagt gcggtggacc c 51

<210> 157  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 157  
acagcgttgt taatcctttt acgctgacga caatagcaag atggaaccac ctga 54

<210> 158  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Pasteurella pneumotropica

<400> 158  
tctagtgatg atggcgaaga ggtcacaccc gttcccatat cga 43

<210> 159  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Stenotrophomonas multophila

<400> 159  
acaagtcaaa gcctgatgac catagcaagt cgggtcccacc ccttcccatc ccga 54

<210> 160  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Vibrio alginolyticus

<400> 160  
gcttggcgac catagcgttt tggacccacc tga 33

<210> 161  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Vibrio fisheri

<400> 161  
ctcatatcta accccctttg ctgacgacaa tagcacgatg gcaccacctg a 51

<210> 162  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Vibrio harveyi

<400> 162  
gcttggcgac catagcgatt tggacccacc tgacttccat tccga 45



<210> 163  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Vibrio proteolyticus*

<400> 163  
gcttggcgac catagcgttt tggacccacc tga 33

<210> 164  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen *Rahnella*, *Serratia*,  
*Yersinia*

<400> 164  
agattttcag cgaagttccg agattggttt caatggc 37

<210> 165  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen *Enterobacter*, *Escherichia*,  
*Klebsiella*, *Pantoea*

<400> 165  
ggaaggagca taciiaagtat 18

<210> 166  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Budvicia aquatica*

<400> 166  
aggtcctga aggaacgttt gagactaaga cg 32

<210> 167  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Buttiauxella agrestis*

<400> 167  
agggtcctga aggaacgttg aagactacga cg 32

<210> 168  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Enterobacter agglomerans*

<400> 168  
aggacactaa aggaacgttg aagacgacga cg 32



<210> 169  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Erwinia carotovora*

<400> 169  
atgcccctga agggccgttg aagactacga cg 32

<210> 170  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Erwinia chrysanthemi*

<400> 170  
aggcccctga agggacgttt aagacgaaga cg 32

<210> 171  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> *Escherichia coli*

<400> 171  
agggtcctga aggaacgttg aagacgacg 29

<210> 172  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Escherichia hermannii*

<400> 172  
agagtcctga aggaacgttg aagacgacga cg 32

<210> 173  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Escherichia vulneris*

<400> 173  
agtctcctga aggaacgttg aagacgacga cg 32

<210> 174  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Hafnia alvei*

<400> 174  
agtctcctaa aggaacgttt aagactaaga cg 32

<210> 175  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen *Klebsiella*, *Kuyvera*

<400> 175





agggtcctga aggaacgttg aagacgacga cg

32

<210> 176

<211> 32

<212> DNA

<213> *Morganella morganii*

<400> 176

agggtcctga aggaacgttt gagactaaga cg

32

<210> 177

<211> 32

<212> DNA

<213> *Pantoea dispersa*

<400> 177

agggtcctga agggacgctg aagacgacga cg

32

<210> 178

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Pantoea*

<400> 178

aggacactaa aggaacgtta aagacgatga cg

32

<210> 179

<211> 32

<212> DNA

<213> *Proteus mirabilis*

<400> 179

agtgacctaa aggaacgttt aagactaaga cg

32

<210> 180

<211> 32

<212> DNA

<213> *Proteus rettgeri*

<400> 180

agggtcctaa aggaacgttt aagactaaga cg

32

<210> 181

<211> 32

<212> DNA

<213> *Providencia stuartii*

<400> 181

agggtcctaa aggaacgttt aagacgaaga cg

32

<210> 182

<211> 32

<212> DNA

<213> *Rahnella aquatilis*



<400> 182  
agccacctga agggacgttt aagactaaga cg 32

<210> 183  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Serratia

<400> 183  
agggccctga aggaacgttt aagactaaga cg 32

<210> 184  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Yersinia enterocolytica

<400> 184  
agggccctga aggaacgtta aagactatga cg 32

<210> 185  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Yersinia pseudotuberculosis

<400> 185  
agggccctga gggaacgtta aagactatga cg 32

<210> 186  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Cedecea davisae

<400> 186  
agggccctga agggacgttg aagactacga cg 32

<210> 187  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen Buttiauxella, Escherichia,  
Klebsiella, Kluyvera, Pantoea

<400> 187  
agatgagttc tccctgaccc ttta 24

<210> 188  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>



<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen Enterobacter, Pantoea

<400> 188  
agatgagttc tcccttgtcc ttta 24

<210> 189  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Erwinia carotovora

<400> 189  
agatgagtct tccctgggca ccag 24

<210> 190  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Erwinia chrysanthemi

<400> 190  
agatgagtct tccctggggc cttg 24

<210> 191  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Escherichia hermannii

<400> 191  
agatgagttc tccctgactc cttg 24

<210> 192  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Escherichia vulneris

<400> 192  
agatgagttc tccctgagac ttta 24

<210> 193  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Hafnia alvei

<400> 193  
agatgagtct tccctgagac cttg 24

<210> 194  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Morganella morganii

<400> 194  
agatgagtct tccctgaccc ttta 24

<210> 195  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Proteus mirabilis



<400> 195  
agatgagtct tccctgtcac ttta 24

<210> 196  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Proteus rettgeri*

<400> 196  
agatgagtct tccctgaccc ttta 24

<210> 197  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Providencia stuartii*

<400> 197  
agatgagtct tccctgactc ttta 24

<210> 198  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 198  
agatgagtct tccctgtggc ttta 24

<210> 199  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Yersinia enterocolitica*

<400> 199  
agatgagtct tccctggggc ttta 24

<210> 200  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Yersinia pseudotuberculosis*

<400> 200  
agatgagtct tccctggggc ttaa 24

<210> 201  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Cedecea davisae*

<400> 201  
agatgaattc tccctgggtc cttg 24

<210> 202  
<211> 199  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>





<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Citrobacter

<400> 202

```
caacgccgaa gatgttttgg cgggaattgag aagattttca gcattgattc agagtccgaa 60
ggattttgcg ctgagacaag gcggcawccc caccacggaa ggagcatata aaagtatgtg 120
actgaggttc gcaagcgcag ccaacgcagt atcagcacia aagacacagg acagagcaca 180
aagaatttct ggcggccgt 199
```

<210> 203

<211> 199

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Citrobacter

<400> 203

```
caacgccgaa gatgttttgg cggattgaga agattttcag tattgattac agattttgcg 60
aaaacgaaaag attttacgct gaggcaaggc ggcaagtga ggcacggaag kggcatataa 120
aagtatgtga ctgaggttcg caggcgcagc caacgcagca tcagtggaaa agattcgttt 180
taagagcaca aagaatttc 199
```

<210> 204

<211> 199

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella

<400> 204

```
caacscsaa gatgttttgg csgatsagag argattttca gcactgattc ckgattttgcg 60
vgaacgaaag attttacgct gaggcaaggc rgcaavcgaa ggaaaggaag gagcatactg 120
aagtatgtga ctgactttac gagcgcagcc aacgctagca tcsgtgtaaa agattcgttt 180
ctggcaacag aatttcctg 199
```

<210> 205

<211> 201

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella

<400> 205

```
caacgccgaa gctgttttgg cggatranaa sacgaacaat tttcagcact gattcagagt 60
tgagtacgca ataatttgcg cagcagcaag gcggcaagcg aaggaaagga aggagcatat 120
agaagtatgt gactgacttt acgagcgcag ccaacgccgc tgatgcgata aagaattgcg 180
tacagagcac aaaagaatat t 201
```

<210> 206

<211> 193

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet



## von Arten der Gattung Salmonella

&lt;400&gt; 206

```

caacgccgaa gatgttttgg csgttgagaa gacgattttc agcagtgatt ccgrgttgag 60
trcgcmrtaa tttkcgcmgc wgcarggcgg cargcgaagg arrggaggga gcatccwgaa 120
gtatktgact gagttttcgr gcgcwggcam cgccgctgat gcgataaaga attgcgtach 180
gmgcacamag aat 193

```

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 199

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella

&lt;400&gt; 207

```

caacgccgaa gatgttttgg cggattgaga gacgattttc agcactgatt ccggattttc 60
gggaacgaaa gattttacgc tgaggcaagg cggcaaatgr aggaaaggaa ggagcatact 120
gaagtatgtg actgactttt cgaatgcagc cgacgcagca tcggtgtaaa agattcgttt 180
ccggcaacag aattgtcct 199

```

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella

&lt;400&gt; 208

```

caacgccgaa gatgttttgg cggatgagag acgattttca gacttgattc agagttgagt 60
acgcaataat ttgcgcagca gcaaggcggc aagcgaagga aaggaaggag catacagaag 120
tatgtgactg agtttacgag cgcaggcaac gccgctgatg cgataaagaa ttgcgtactg 180
agcataaaa 189

```

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella

&lt;400&gt; 209

```

caacgccgaa gatgttttgg cggattgaga agacaacaat tttcagcyca gattcagagt 60
ccgaaggatt ttacgctgag acaaggcggc aaacgcagcs mcsgaaggas cmycacagaa 120
gtatgtgact gacgctcgca agagcagcca acgccgtatc agtgtaaaag acacaggacg 180
grgcacaaag aaattt 196

```

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Salmonella



<400> 210  
gagagacgat ttccagcact gattccggat ttccgggaac gaaagataaa agattcgttt 60  
ccggcaacag aatttcc 77

<210> 211  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten und Gattungen der Eubakterien

<400> 211  
ggtacgcgag ctgggttttag aacg 24

<210> 212  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten und Gattungen der Eubakterien

<400> 212  
gbgagagtag gdmayygcc 19

<210> 213  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 213  
ccggagtgga cgaacctctg gtgttcgggt tgtcacgcca gtggcattgc cggg 54

<210> 214  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 214  
ccggagtgga cgtactctgg tgttcgggtt gttctgccaa gggcattgcc ggg 53

<210> 215  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Agrobacterium vitis

<400> 215  
ccgggatgga catatctctg gtggacctgt tgtcgtgcc aacgcatagc aggg 54

<210> 216  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Adalia bipunctata

<400> 216



ccgaggtgga cgtacctctg gtggaccagt tgtcatgcca atggcacagc tggg 54

<210> 217  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Amycolatopsis orientalis

<400> 217  
ccgggacgga cgaacctctg gtgtgccagt tgtcctgcca agggcatggc tggg 54

<210> 218  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Brucella ovis

<400> 218  
ccgggatgga cgtatctntg gtggacctgt tgtggcgcca gccgcatagc aggg 54

<210> 219  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Bradyrhizobium japonicum

<400> 219  
ccggggtgaa cgtacctctg gtggagctgt tgtcgcgcca gcggcagtgc agca 54

<210> 220  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas paucimobilis

<400> 220  
ccgggatgga cgcaccgctg gtgtaccagt tgttctgcca agggcatcgc tggg 54

<210> 221  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 221  
ccgggatgga cgcaccgctg gtgtaccagt tgttctgcca agggcatcgc tggg 54

<210> 222  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Rickettsia prowazekii

<400> 222  
ccgaggtgga cgtaccctctg gtggaccagt tgtcgtgcca acggcaagct gggtagc 57

<210> 223  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Sphingomonas paucimobilis

<400> 223  
ccggagtgga cgaacctctg gtgtaccggt tgtcacgcca gtggcattgc cggg 54





<210> 224  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 224  
ccggggtgaa catgcctctg gtggacctgt cgtggcgcca gccgcgcagc aggg 54

<210> 225  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Alcaligenes*

<400> 225  
ccagagtgga cgaacctctg gtgtaccggt tgtgacgcca gtcgcatcgc cggg 54

<210> 226  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas cepacia*

<400> 226  
ccgggacgac gaacctctgg tgtgtcagtt gtactgcaa gtgcaccgct gat 53

<210> 227  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Ralstonia pickettii*

<400> 227  
ccggagtgga cgaacctctg gtgttccggt tgtcacgcca gtggcattgc cggg 54

<210> 228  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Campylobacter jejuni*

<400> 228  
ccgggttgaa caaaccactg gtgtagctgt tgttctgcca agagcatcgc agcg 54

<210> 229  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 229  
ccgggatgga cgtgtcactg gtgcaccagt tgtctgcaa gagcatcgct ggg 53

<210> 230  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Actinoplanes utahensis*

<400> 230



ccgggacgga cgaacctctg gtgtgccagt tgttctgcca agagcacggc tgg 53

<210> 231  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 231  
ccgggatgga cacaccgctg gtgtaccagt tgttccgcca ggagcatcgc tggg 54

<210> 232  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 232  
ccgggatgga cgcaccgctg gtgtaccagt tgttctgcca agggcatcgc tggg 54

<210> 233  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 233  
ccgggatgga ctgacctctg gtgtaccagt tgttccgcca ggagcatggc tggg 54

<210> 234  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 234  
ccgggacgga cgaacctctg gtgtgccagt tgttctgcca agggcatggc tggt 54

<210> 235  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Microbispora bispore*

<400> 235  
ccggaacgga cgaacctctg gtgtgccagt tgtgccgcca ggtgcacggc tggt 54

<210> 236  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium leprae*

<400> 236  
ccgggacgga cgaacctctg gtataccagt tgtctcacca ggggcaccgc tgga 54

<210> 237  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium smegmatis*



<400> 237  
ccgggacgga cgaacctctg gtataccagt tgtcccacca ggggcacggc tgga 54

<210> 238  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 238  
ccgggacgga cgaacctctg gtgcaccagt tgtcccgcca ggggcaccgc tgga 54

<210> 239  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium gallisepticum

<400> 239  
ccggagtga gacacctctt gtgtccagt tgtagcgcca actgcaccgc tggg 54

<210> 240  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 240  
ccgggacgga ccaacctctg gtgtgccagt tgttcacca ggagcatggc tggttggc 58

<210> 241  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 241  
ccgggacgga cgaacctctg gtgtgccagt tgttcgcca ggagcaccgc tggt 54

<210> 242  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus fascians

<400> 242  
ccgggacgac gaacctctgg tgtgccagtt gttccaccag gagcaccgct ggttggc 57

<210> 243  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 243  
ccgggatgga catacctctg gtgtaccagt tgtcgtgcca acggcatagc tgggtagc 58

<210> 244  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Streptococcus faecalis

<400> 244



ccgggatgga cttncgctg gtgtaccagt tgttctgcca agggcattgc tggg 54

<210> 245

<211> 54

<212> DNA

<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 245

ccgggatgga cttncgctg gtgtaccagt tgttctgcca agggcattgc tggg 54

<210> 246

<211> 54

<212> DNA

<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 246

ccggagtgga cgtaccgctg gtgtacctgt tgtctcgcca gaggcacgc aggg 54

<210> 247

<211> 54

<212> DNA

<213> *Sphingobacterium multivorans*

<400> 247

ccgggttgga cagacctctg gtgaacctgt catnccgcca ggtgtacggc aggg 54

<210> 248

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 248

ccggaggaac gcaccgctgg tgtaccagtt atcgtgccaa cggtaaacgc tggg 54

<210> 249

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 249

ccgggaagta cgcacctctg gtgtacctgt tatcgtgcca acggtaaacg caggg 55

<210> 250

<211> 59

<212> DNA

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 250

ccgagatgga cgaacctcta gtgtaccagt tatcctgcca agggtaagtg ctgggtagc 59





<210> 251  
<211> 58  
<212> DNA  
<213> Chlamydia trachomatis

<400> 251  
ccggaatgga cgaaccaatg gtgtgtcggg tgttttgcca agggcatagc cgagtagc 58

<210> 252  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 252  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacttgccctc aa 42

<210> 253  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 253  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga gccatcctaa g 41

<210> 254  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Agrobacterium vitis

<400> 254  
tggaataaccg ctgaaggcat ctaagcggga aaccaacctg a 41

<210> 255  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Adalia bipunctata

<400> 255  
gggataaccg ctgaatgcat ctaagcagga aactcacctc a 41

<210> 256  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Amycolatopsis orientalis

<400> 256  
aggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctgcttc g 41

<210> 257  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Brucella ovis

<400> 257  
gggataaccg ctgaaggcat ntaagcggga aaccacacctg aa 42

<210> 258  
<211> 41



<212> DNA  
<213> *Bradyrhizobium japonicum*

<400> 258  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacccacctc a 41

<210> 259  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas paucimobilis*

<400> 259  
gggataagtg ctgaaagcat ctaagcatga agccccctc a 41

<210> 260  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Rhodobacter sphaeroides*

<400> 260  
aggataaccg ctgaaggcat ctaagcggga agcccccttc a 41

<210> 261  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Rickettsia prowazekii*

<400> 261  
gggataactg ctgaatgcat ctaagcagga aacccacctc 40

<210> 262  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Sphingomonas paucimobilis*

<400> 262  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacttgccctt g 41

<210> 263  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 263  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctccctc a 41

<210> 264  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Alcaligenes*

<400> 264  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctacctc a 41



<210> 265  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas cepacia*

<400> 265  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agctcgcttc a 41

<210> 266  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Ralstonia pickettii*

<400> 266  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggaa aacttgccctc a 41

<210> 267  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Campylobacter jejuni*

<400> 267  
aggataaagc ctgaaagcat ctaagcgtga agccaactct a 41

<210> 268  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 268  
tgtgataact gctgaaagca tctaagcagg aaccaactcc aa 42

<210> 269  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Actinoplanes utahensis*

<400> 269  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agctcgcttc g 41

<210> 270  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 270  
gggataagtg ctgaaagcat ctaagcatga agccccctc a 41

<210> 271  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 271  
gggataaagc ctgaaagcat ctaagcgtga agcccacctc 40

<210> 272  
<211> 41



<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 272  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctgcttc g 41

<210> 273  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Microbispora bispora

<400> 273  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcccgcccc g 41

<210> 274  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium leprae

<400> 274  
aagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aaccttctcc a 41

<210> 275  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 275  
aggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aacctcttcc a 41

<210> 276  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 276  
aggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aaccttctcc a 41

<210> 277  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium gallisepticum

<400> 277  
cggataaacg ctgaaagcat ctaagtgtga aaccgacttt a 41

<210> 278  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 278  
agtgataacc gctgaaagca tctaagtggg aagcacgctt caa 43





<210> 279  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 279  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctgttcc a 41

<210> 280  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 280  
gggataagtg ctgaaagcat ctaagcatga agccccctc a 41

<210> 281  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 281  
gggataaacg ctgaaagcat ctaagtgtga agccncctc a 41

<210> 282  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 282  
gggataaccg ctgaaagcat ctaagcggga agcctgcttc g 41

<210> 283  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 283  
gagataaccg ctgaaagcat ctaagcggga aactcgcctg a 41

<210> 284  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Sphingobacterium multivorans*

<400> 284  
tagataagcg ctgaaagcat ctaagtgcga aactagccac g 41

<210> 285  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 285  
gtggataacc gctgaaagca tctaagtggg aagccacct caa 43



<210> 286  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 286  
gtggataacc gctgaaagca tctaagtggg aagcccacct caa 43

<210> 287  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 287  
aggataaccg ctgaaagcat ctaagtggga agccttcctc a 41

<210> 288  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 288  
aggataagca ttgaaagcat ctaaagtcca agcctccctc a 41

<210> 289  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas stutzeri*

<400> 289  
agatgagatc tcaactggagc cttg 24

<210> 290  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> *Thiobacillus ferrooxidans*

<400> 290  
atgagatctc ccgggcata 19

<210> 291  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> *Agrobacterium vitis*

<400> 291  
aaacgagtat tccctatc 18

<210> 292  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> *Adalia bipunctata*



<400> 292  
aaactagact tccccatc 18

<210> 293  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Amycolatopsis orientalis

<400> 293  
agatgagggc tcccacctcc ttg 23

<210> 294  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Brucella ovis

<400> 294  
aaacgagtat tccctatc 18

<210> 295  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Bradyrhizobium japonicum

<400> 295  
aaacgagcat tcccttg 17

<210> 296  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas paucimobilis

<400> 296  
agatgagatt tcccattccg ca 22

<210> 297  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 297  
agatgagatt tcccattccg ca 22

<210> 298  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Rickettsia prowazekii

<400> 298  
aaactagact tcccatt 18

<210> 299  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Sphingomonas paucimobilis

<400> 299  
agatgagatt tcccggagcc ttg 23



<210> 300  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 300  
agataagata tctc 14

<210> 301  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Alcaligenes*

<400> 301  
agataagatt tccctaggac ttta 24

<210> 302  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas cepacia*

<400> 302  
agatgagatt tccatacacc ttg 23

<210> 303  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Ralstonia pickettii*

<400> 303  
agatgagatc tcactggaac cttg 24

<210> 304  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> *Campylobacter jejuni*

<400> 304  
agatgaatct tctctaagct ctct 24

<210> 305  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 305  
gataaacttt ccc 13

<210> 306  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> *Actinoplanes utahensis*





<400> 306  
agatgaggta tcccaccacc ttg 23

<210> 307  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Bacillus halodurans

<400> 307  
agatgagatt tcccatggag ta 22

<210> 308  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Clostridium tyrobutyricum

<400> 308  
agattagatt tcccacagcg ta 22

<210> 309  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 309  
agatgaggtc tcccacaggg tag 23

<210> 310  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Microbispora bispora

<400> 310  
agatgaggtc tccctccggg tta 23

<210> 311  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium leprae

<400> 311  
agatcagggt tcttaccac tt 22

<210> 312  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 312  
agaccaggct tctcaccctc ta 22

<210> 313  
<211> 22  
<212> DNA



<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 313

agatcagggtt tctcaccac tt

22

<210> 314

<211> 30

<212> DNA

<213> *Mycobacterium gallisepticum*

<400> 314

agaataatct tcccttccag caatggagta

30

<210> 315

<211> 21

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 315

gatgagggtt cctgcacagt t

21

<210> 316

<211> 22

<212> DNA

<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 316

agatgagggtt tctcaccacc tc

22

<210> 317

<211> 20

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 317

agatgagatt tcccaacttc

20

<210> 318

<211> 22

<212> DNA

<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 318

agatgagatt tccatttct tt

22

<210> 319

<211> 23

<212> DNA

<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 319

agatgaggac tcccaccccc ttg

23

<210> 320

<211> 24

<212> DNA

<213> *Flavobacterium resinovorum*



<400> 320 agatgaggat tccctggcgg cttg	24
<210> 321 <211> 17 <212> DNA <213> <i>Sphingobacterium multivorans</i>	
<400> 321 agatgagact tccttat	17
<210> 322 <211> 20 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet von Arten der Gattung <i>Synechococcus</i>	
<400> 322 gatgagtact ctcattgcat	20
<210> 323 <211> 21 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz	
<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet von Arten der Gattung <i>Synechocystis</i>	
<400> 323 gatgagtact ctcattggtgt t	21
<210> 324 <211> 16 <212> DNA <213> <i>Borrelia burgdorferi</i>	
<400> 324 agatgagata tccttt	16
<210> 325 <211> 14 <212> DNA <213> <i>Chlamydia trachomatis</i>	
<400> 325 agataaggta tccc	14
<210> 326 <211> 32 <212> DNA <213> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<400> 326 agctccctga agggccgtcg aagactacga cg	32



<210> 327  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Thiobacillus ferrooxidans*

<400> 327  
agccccctga agggacgtgg aagactacca cg

32

<210> 328  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> *Agrobacterium vitis*

<400> 328  
agagccgtgg aagacgacca cg

22

<210> 329  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> *Adalia bipunctata*

<400> 329  
agagccgtgg aagaccacca cg

22

<210> 330  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Amycolatopsis orientalis*

<400> 330  
aggggttaag gctcccagta gacgactggg

30

<210> 331  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen *Brucella*, *Bradyrhizobium*

<400> 331  
agagccgtgg aagaccacca cg

22

<210> 332  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas paucimobilis*

<400> 332  
aggaagtaag atccctgaaa gatgatcagg

30

<210> 333  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>





<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattungen Rhodobacter, Rickettsia

<400> 333  
agggccgtgg aagaccacca cg 22

<210> 334  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Sphingomonas paucimobilis

<400> 334  
agctccttga agggtcgttc gagacc 26

<210> 335  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Zymomonas mobilis

<400> 335  
agagccgtcg aagactacga cg 22

<210> 336  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Alcaligenes

<400> 336  
tgtcctctaa agagccgttc gagact 26

<210> 337  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas cepacia

<400> 337  
tgtgtgagag gccccagcc agacc 25

<210> 338  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Ralstonia pickettii

<400> 338  
agttccctga agggccgtcg aagact 26

<210> 339  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Campylobacter jejuni

<400> 339  
agaagactac tagt 14



<210> 340  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 340  
tgaagctcgc acaaagacta tgtgc 25

<210> 341  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> *Actinoplanes utahensis*

<400> 341  
agtgggtaag gctcccagct agactact 28

<210> 342  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 342  
aatccagtaa gaccccttag agatgatgag g 31

<210> 343  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 343  
aggaagtaag atccctgaaa gatgatcagg 30

<210> 344  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 344  
agctggtgtaag gccccttgaa gaacacaagg tg 32

<210> 345  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 345  
cctggtaagg cccccgacta gatgatcggg 30

<210> 346  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Microbispora bispora*

<400> 346  
accgggtaag gctcccagta gatgactggg 30



<210> 347  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium leprae*

<400> 347  
ggtgggataa ggccccccgc agaacacggg a 31

<210> 348  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 348  
ggagggataa ggccccccgc agaccacggg a 31

<210> 349  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 349  
ggtgggataa ggccccccgc agaacacggg t 31

<210> 350  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 350  
aatgtggtaa ggcccccggt agaccaccgg 30

<210> 351  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 351  
gagggggtaa ggcccccggc agaccaccgg g 31

<210> 352  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 352  
ggttataaga tccctcaaag atgatgagg 29

<210> 353  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 353  
aagaaagtaa gaccctnan agatgatcag g 31



<210> 354  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 354  
aggggttaag gctccagta gacgactggg 30

<210> 355  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 355  
accgccttga agggtcgttc gagaccagga cg 32

<210> 356  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> *Sphingobacterium multivorans*

<400> 356  
agggtcgtag aagatgacta cg 22

<210> 357  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 357  
aagccagtaa ggtcacgggt agaacacccg 30

<210> 358  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 358  
aagccagtaa ggtcacggga agactacccg 30

<210> 359  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 359  
aagggtcctg gaagaatacc agg 23

<210> 360  
<211> 26  
<212> DNA





<213> Chlamydia trachomatis

<400> 360

aatgagactc catgtagact acgtgg

26

<210> 361

<211> 40

<212> DNA

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 361

agtaatgcat taagctaacc agtactaatt gcccgtagcg

40

<210> 362

<211> 40

<212> DNA

<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 362

agcaatgcgt gcagctaagg agtactaatc gcccgtagcg

40

<210> 363

<211> 40

<212> DNA

<213> Agrobacterium vitis

<400> 363

ggtaacctgc gaagcttacc gttactaata gctcgattgg

40

<210> 364

<211> 40

<212> DNA

<213> Adalia bipunctata

<400> 364

agtaatgcgt gtagctaacc gatactaata gctcgattga

40

<210> 365

<211> 40

<212> DNA

<213> Brucella ovis

<400> 365

ggcaacgcat gcagcttacc ggtactaata gctcgatcga

40

<210> 366

<211> 40

<212> DNA

<213> Bradyrhizobium japonicum

<400> 366

agtaatgcat gcagcttacc ggtactaatc gttcgattgg

40

<210> 367

<211> 40

<212> DNA

<213> Pseudomonas paucimobilis



<400> 367  
ggcgacacat ggagctgaca gataactaatc gatcgaggac 40

<210> 368  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 368  
agcaatgcgt tcagctgact ggtactaatt gcccgatagg 40

<210> 369  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rickettsia prowazekii

<400> 369  
agtaatgtgt gtagctaacc gataactaata gctcgattga 40

<210> 370  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Sphingomonas paucimobilis

<400> 370  
agtaatgcat taagctaacc agtactaatt gcccgtncgg 40

<210> 371  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Zymomonas mobilis

<400> 371  
ggtaacacat gtagctaact ggtcctaatt gctctattca 40

<210> 372  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Alcaligenes

<400> 372  
agtgatatgt gaagctgacc aataactaatt gctcgtgagg 40

<210> 373  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Ralstonia pickettii

<400> 373  
tgtgaggcgt tgagctaacc aataactaatt gcccgtgagg 40

<210> 374  
<211> 40  
<212> DNA



<213> Campylobacter jejuni

<400> 374

tgaaagtcct ttagctgacc agtactaata gagcgtttgg

40

<210> 375

<211> 40

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 375

agtaatgcgt ttagctgact actactaata gagcgtttgg

40

<210> 376

<211> 40

<212> DNA

<213> Bacillus halodurans

<400> 376

ggcgacacgt gaagctgaca gatactaata ggctcgaggac

40

<210> 377

<211> 40

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 377

ggcgacacat ggagctgaca gatactaata gatcgaggac

40

<210> 378

<211> 40

<212> DNA

<213> Clostridium tyrobutyricum

<400> 378

ggcaacatgt tcagctgact gatactaata ggccgagggc

40

<210> 379

<211> 41

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 379

cggtgacgca tggagctgac cggtactaat aggccgaggg c

41

<210> 380

<211> 42

<212> DNA

<213> Microbispora bispora

<400> 380

cggtaacgtg tggagccgac cggtactaat aagccgagag gc

42

<210> 381



<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium leprae*

<400> 381  
cagtaatgag tgtagggaac tggcactaac tggccgaaaag c 41

<210> 382  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 382  
tagtaatagg tgcagggaac tggcactaac cggccgaaaa c 41

<210> 383  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 383  
cagtaatggg tgtagggaac tgggtgctaac cggccgaaaa c 41

<210> 384  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium gallisepticum*

<400> 384  
agaatcggtg tagactacga cggtgatagg ctaaagggtg aagtgccgcg aggtatttag 60  
ctgattagta ctaataattc gaggac 86

<210> 385  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 385  
gctgaccgat actaagtggc cgagggc 27

<210> 386  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 386  
cagtaatgca tgcaggtgac tgggtactaat aggccgagga c 41

<210> 387  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus fascians*

<400> 387  
cagcaatgta tgcaggtgac tgggtactaat aggccgagga c 41

<210> 388  
<211> 27





<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 388  
gctgacgaat actaatcgat cgagggc 27

<210> 389  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 389  
gcggaccaat actaatcggc cgaggac 27

<210> 390  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 390  
ccgcaagggtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggc cttgtcctca t 51

<210> 391  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces galbus*

<400> 391  
cggtaacgtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggc cttgtcctca g 51

<210> 392  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces griseus*

<400> 392  
cggtaacggg tggagctgac tggactaat aggccgaggc cttgtcctca g 51

<210> 393  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces lividans*

<400> 393  
ccgtgagggtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggc cttgtcctca g 51

<210> 394  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces mashuensis*

<400> 394  
cggtaacggc tggagctgac tggactaat aggccgaggc cttgtccata g 51

<210> 395  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*



<400> 395  
gctaaccagt actaattgcc cgtaaggc 28

<210> 396  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> *Sphingobacterium multivorans*

<400> 396  
gccaagtggg actaatagcc cgaagctt 28

<210> 397  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 397  
gctgaggcgt actaatagac cgagggc 27

<210> 398  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 398  
gtcgaggagt actaatagac cgagggc 27

<210> 399  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 399  
gctgactaat actaattacc cgtatct 27

<210> 400  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 400  
gctaaccaat actaataagt ccaaagac 28

<210> 401  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> *Salmonella typhi*

<400> 401  
cttaacctta caacgccgaa gatgttttgg cggatg 36



<210> 402  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Buchnera aphidocola

<400> 402  
cttaacctta caacaccaga ggtgtttttt ataaa 35

<210> 403  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 403  
cttgaccata taacacccaa acaatttgat gtttg 35

<210> 404  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 404  
cttgaccata tatcaccaag cattaaagag cttcc 35

<210> 405  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Sphingomonas paucimobilis

<400> 405  
cttgtcccta taaccttggt agtccaaggt cgagt 35

<210> 406  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Alcaligenes

<400> 406  
cttgactata caacacccaa gcagttgtat ataaa 35

<210> 407  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas cepacia

<400> 407  
aggactaacg actcgtgaag ctg 23

<210> 408  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Ralstonia pickettii



<400> 408  
cttgaccata taacacccaa gcaatttga 29

<210> 409  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Campylobacter jejuni

<400> 409  
cttatcttta ataaagcatc acttccttgt taagg 35

<210> 410  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Helicobacter pylori

<400> 410  
cttggtttttt gcttttttgat aagataacgg caata 35

<210> 411  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Actinoplanes utahensis

<400> 411  
cggtaacgtg ttgagttgac cggactaat agg 33

<210> 412  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Bacillus halodurans

<400> 412  
ttatccaaaa acaaatcaaa agcaacgtct cgaac 35

<210> 413  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Bacillus subtilis

<400> 413  
ttaaccacat tttgaatgat g 21

<210> 414  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Clostridium tyrobutyricum

<400> 414  
ttgaccaaatt ttatcttact gtgcaatttt ca 32

<210> 415  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet





von Arten der Gattung Frankia

<400> 415  
cggtgacgca tggagctgac cggtactaat aggccgaggg cttgtcttcg aaggtg 56

<210> 416  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> Microbispora bispora

<400> 416  
cggtaacgtg tggagccgac cggtactaat aagccgagag gcttgacttc acatgc 56

<210> 417  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium leprae

<400> 417  
cagtaatgag tgtagggaac tggcactaac tggccgaaag cttacaaaac acacac 56

<210> 418  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 418  
tagtaatagg tgcagggaac tggcactaac cggccgaaaa cttacaacac cccata 56

<210> 419  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 419  
cagtaatggg tgtagggaac tgggtgctaac cggccgaaaa cttacaacac cctccc 56

<210> 420  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium gallisepticum

<400> 420  
cgttgatagg ctaaaggtgt aagtgccgag aggtattta 39

<210> 421  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 421  
ttgtcccaca ctttaattct tgtagattgt tgtgaagag 39

<210> 422  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus erythropolis



<400> 422  
cagtaatgca tgcaggtgac tggactaat aggccgagga c 41

<210> 423  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus fascians*

<400> 423  
cagcaatgta tgcaggtgac tggactaat aggccgagga c 41

<210> 424  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 424  
ttaacaaaa taaatgtttt gcgaagcaaa atc 33

<210> 425  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 425  
ttaaccaaag aatggataag taaaagcaac ttggttattt tg 42

<210> 426  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces lividans*

<400> 426  
ccgcaaggtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggg cttgtcctca ttgct 56

<210> 427  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces mashuensis*

<400> 427  
cggtaacggt tggagctgac tggactaat aggccgaggg cttgtccata gttgct 56

<210> 428  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 428  
cttgatccta taaccagtgt gttttgcctg gtgggtgatc gcg 43

<210> 429  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet



von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 429  
ttgacctcta acactttgat atcggcac 28

<210> 430  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 430  
ttgaccttta ttcttcattt ttctttct 28

<210> 431  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 431  
cttggctctt ttatgattgg aagagccgaa aggc 34

<210> 432  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Salmonella typhi*

<400> 432  
cttaacctta caacaccgaa ggtgttttgg aggataaaaag aaacagaatt t 51

<210> 433  
<211> 117  
<212> DNA  
<213> *Buchnera aphidocola*

<400> 433  
cttaacctta caacaccaga ggtgtttttt ataaaaata aaaaatcttg ttttactgaa 60  
tttattgttg tattaatata tatatattat aatagcacta aaaaatgcct ggtaaaa 117

<210> 434  
<211> 233  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas stutzeri*

<400> 434  
cttgaccata taacacccaa acaatttgat gtttgcgtgt cagacgggtg aagtcgacaa 60  
acaaaccgaa agacgcaacg ctgcgaaagc gaaagcgata ccgaagcaac catcacatac 120  
ccaattaggg aagcgactca acaccgactc cccagttgaa cttgcttgac gaccatagag 180  
cgttggaacc acctgatccc atcccgaact cagtagtgaa acgacgcac gcc 233

<210> 435  
<211> 91  
<212> DNA  
<213> *Thiobacillus ferrooxidans*

<400> 435



cttgaccata taccaccaag cattaaagag cttcccttca gcaacacctc gagggcgcca 60  
cagccgcgcc cgggaccaga ccagttttaa c 91

<210> 436  
<211> 230  
<212> DNA  
<213> *Agrobacterium vitis*

<400> 436  
cttaatcggt ctcattgacc atgctcatcg acttcgtcga tgagccatct gtttagcgct 60  
cagcatgag cggctcgtat acgagcctat gctccgcgag ggcgccgaac gatcggcgac 120  
gcgccttgcg cttgcggact tcgtccgaaa gtgccaaagca aaacgtcgcg gaatgacgtg 180  
ttcacacaat aagaaaacgg gcaatgcccg ccagcttctc atcaacattg 230

<210> 437  
<211> 162  
<212> DNA  
<213> *Adalia bipunctata*

<400> 437  
tttactttgc tgtgagatta cacatgcata tgggtgtaat tctataaaca tgtaagtatc 60  
aactcacaaa gttatcaggt taaattagct ttatcaacca ataaagatgt tgttacatgt 120  
ctctttctat gttgttcctg tgaaagtaag aatctagaaa aa 162

<210> 438  
<211> 120  
<212> DNA  
<213> *Amycolatopsis orientalis*

<400> 438  
tggtaacggg tggagttgac tggactaat aggcggaggg cttgtcctca gttgctcgcg 60  
tccactgtgt tagttctgaa gtaacgaaca tcgccttgtc ggctggagtt caacttcata 120

<210> 439  
<211> 189  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Brucella*

<400> 439  
cttgatcact cccattttaca atatccatca agcaaaagct tgatgttgaa ggcaatatgg 60  
aagtagggca ataaggcaat atgtttgccc aaagccctca accatcgcca cgcagaaaaa 120  
caaagcacaa aggcaaagaa caggcgcagc ccaaacatac tgccctattc ccctaattgc 180  
ttaagcccc 189

<210> 440  
<211> 109  
<212> DNA  
<213> *Bradyrhizobium japonicum*

<400> 440  
cttgattgct ctcattttca gtgtccatag ggccgcaagg cccgcgacca gaatgaaatg 60  
agaggcgcta gtcgccaac aaagatcgct tgcttcgtat tccttgctc 109

<210> 441  
<211> 125





&lt;212&gt; DNA

<213> *Pseudomonas paucimobilis*

&lt;400&gt; 441

```

cttaaccaat ttgaatgtat gcttactgtt atctagtttt gagagaacac tctcaatggg 60
ttgggtggcg tagcgaagag gtcacacccg ttcccatgcc gaacacggaa gttaagctct 120
tcagc 125

```

&lt;210&gt; 442

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

<213> *Rhodobacter sphaeroides*

&lt;400&gt; 442

```

cttgatctga cccggttaaca gcaaggctca aaagccaacg ctctacccca gatcagaagc 60
aatagaccgc gaacaagcaa aagcctgatg ttgtcgtttc 100

```

&lt;210&gt; 443

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; DNA

<213> *Rickettsia prowazekii*

&lt;400&gt; 443

```

tttactttgc tgtgagatta tatatgcata tagtggttaat tatataagta ttttaagcatc 60
aatgtgtaaa ttataatttt aatgtttaa atagctttatc aataaataaa aatgtttattc 120
tatcggtttta tggtacgatt tgatagtaaa gttttgatct ttctttaaga tattgtagac 180
aattgtatat tatacc 196

```

&lt;210&gt; 444

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt; DNA

<213> *Pseudomonas cepacia*

&lt;400&gt; 444

```

aggactaacg actcgtgaag ctgaccggta ctaataggcc gataacttac accacacacc 60
cttttcgtga acggattcaa aagacgttca caccaggaga gggtaaaaag aaaaaacaag 120
actgcttgcg tccactatgt gggtcccaac caacaaaccc gccacgggca cggtgcgaca 180
ggaacacaac tgaataacaa caccacaatg ttgtaaccac aaagacttcc cccccccggc 240
atcagaccc 249

```

&lt;210&gt; 445

&lt;211&gt; 209

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ralstonia pickettii*

&lt;400&gt; 445

```

cttgaccata taacacccaa gcaatttgag cgtaggcgcc aaattgtggg ggtgaagatg 60
atacgaaccg aaagttcgca acgaaccaca acatcacata tccgaattcg ctgggctgtc 120
catctggaca ttctggctac agaatttctt gacgaccata gagcattgga accacctgat 180
cccatcccga actcagcagt gnaacgatg 209

```

&lt;210&gt; 446

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; DNA

<213> *Campylobacter jejuni*

&lt;400&gt; 446

```

cttatcttta ataaagcatc acttccttgt taagggtttt aagaagactt tgaatataga 60
taatatttag agtttaatat aaatctttca agtaaagttt gtattagaac ttgctcttaa 120
cattgttttt taagtattct atataaaaac ttatcaaaga taaaagataa gaaaagaaga 180

```



aagagaataa aagattaagt tttattctta aattcaattt ttcaaagaat atttaaataa 240  
caatgtccgt gattatacag atgtggaaac g 271

<210> 447  
<211> 228  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 447  
cttgtttttt gctttttgat aagataacgg caataagcgc gaatgggtta ccactgcctt 60  
actgagtgtgta agagagttgg agttttatga agacttttat aagattaaac tttaatgagg 120  
aatgagatac catctcaatg gtttaaagtt aaaggctatt aacgatcttc tttgttaaaa 180  
acagctcccc tataaagaga aaggggagtt aagggtaaatt gcgttttt 228

<210> 448  
<211> 155  
<212> DNA  
<213> *Actinoplanes utahensis*

<400> 448  
cggtaacgtg ttgagttgac cgggtactaat aggccgaggg cttaaccacc cttaaattttc 60  
tgcttgctgc cactgtgtga ttcacagcaa acgaacaacc accccgggtc aagagtgccg 120  
ggttgctggt ttgttctgct gatggctggt tcgat 155

<210> 449  
<211> 296  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 449  
cttatccaaa aacaaatcaa aagcaacgtc tcgaactcga gaagcgtccc attatctagt 60  
tttgagagaa tcttgttctc caaagaagcg ctccgacgca gcatcgcaag atgcgaagtt 120  
gatcggaagc cgtgatcaag agattattct cttagggtcca aagaaaaggg tttcgagaaa 180  
cgagcagttt taggaatcga gcgacgacag atcggagcgt acacacggtg cgtgaggatc 240  
tggaggagtg aagatgacac caaaatgcga tgttgatcgg aggcgtaac tatcta 296

<210> 450  
<211> 122  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 450  
cttaaccaca ttttgaatga tgtcacacct gttatctagt tttgagagaa cacctctcta 60  
aaggcggaag gtaaggaaac tccgctaagg gctctcacat cctgtgagaa acgcccagta 120  
cc 122

<210> 451  
<211> 209  
<212> DNA  
<213> *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 451  
cttgaccaaaa tttatcttac tgtgcaattt tcagagaata attattctct tatctccatt 60  
agaaatataa tgtttctatt ttattataga gaataaagta agtaaattga taataaccat 120  
tagtacaagg aagatatgag cgaagagcgg aatttactta ggtaaattgag cactggagtg 180  
aataattctg acggtgtaat gagaagtta 209

<210> 452  
<211> 100



<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 452  
cggtagcgca tggagctgac cggtagctaat aggcgaggg cttgtcttcg aaggtgctac 60  
gcgtccactg tgcggttctc ggggtgtacgg cgggttcggc 100

<210> 453  
<211> 85  
<212> DNA  
<213> Microbispora bispora

<400> 453  
cggtaacgtg tggagccgac cggtagctaat aagccgagag gcttgacttc acatgcacgc 60  
accactatg cgattctcga tcagc 85

<210> 454  
<211> 124  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium leprae

<400> 454  
cagtaatgag tgtagggaac tggcactaac tggccgaaa cttacaaaac acacacatcg 60  
caaccacata attcagatcc actttgtcgt ggagcatcac acccccatc agaacaaatt 120  
ttaa 124

<210> 455  
<211> 146  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 455  
tagtaatagg tgcaggaac tggcactaac cggccgaaaa cttacaacac cccataatcg 60  
ttgtaagaag aaacattga cgcaccgcgc tcgcaaccac actccacgga tgatcaaacc 120  
cacaagttg ctctccatgt gggcca 146

<210> 456  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 456  
cagtaatggg tgtagggaac tggtagctaac cggccgaaaa cttacaacac cctccctttt 60  
ggaaaagga ggcaaaaaca aactcgcaac cacatccgtt cacggcgcta gccgtgcgtc 120  
cacaccccc accag 135

<210> 457  
<211> 169  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium gallisepticum

<400> 457  
cgttgatagg ctaaagggtg aagtgccgcg aggtatttag ctgattagta ctaataattc 60  
gaggacttag atttgatcaa aaacattagc tgttttttat ctaatatgat ttgttgattt 120  
ttgtttttca aagagcaatg tgtgtgatat cgatatcgtg atggaaaca 169



<210> 458  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 458  
cttgtcccac actttaattc ttgtagattg ttgtgaagag ttt

43

<210> 459  
<211> 182  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 459  
cagtaatgca tgcaggtgac tggactaat aggccgagga cttaccacaa agaagctacg 60  
cgtccactgt gcggtatctg aaacaacaca cagatactga tgagaaaccc tgttttctcc 120  
atcccccaac accagaaact ggtgttgacg tggtgaaacc aggtgatcag aagaaggta 180  
ct 182

<210> 460  
<211> 168  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus fascians*

<400> 460  
cagcaatgta tgcaggtgac tggactaat aggccgagga cttaccacaa agaagctacg 60  
cgtccactgt gcaatatctg aaacaacaca cgagtagttg ttcgacaaca gaaccgaata 120  
cacgaatccg ccacccacac gagtgtgggt gacaggttcg ctcgttga 168

<210> 461  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 461  
cttaaccaa ataatgttt tgcgaagcaa aatcactttt acttactatc tagttttgaa 60  
tgta 64

<210> 462  
<211> 87  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 462  
cttaaccaa gaatggataa gtaaaagcaa cttggttatt ttgattcaaa cttcaatcca 60  
gttttgagt aatnaagatt cnetcaa 87

<210> 463  
<211> 123  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 463  
ccgcaagggtg tggagggtgac cgtactaat aggccgaggg cttgtcctca tttgctcgcg 60  
tccactgtgt tggttctgaa accacgaaca accccatgtg ccacacatgg tgcggttgtc 120  
agt 123

<210> 464





<211> 134  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces galbus*

<400> 464  
cggtaacgtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggg cttgtcctca gttgctcgcg 60  
tccactgtgt tggttctgaa accacgaaca gccccatgct ctggcatggg gcggcattgt 120  
tcgacagttt cata 134

<210> 465  
<211> 143  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces griseus*

<400> 465  
cggtaacggg tggagctgac tggactaat aggccgaggg cttgtcctca gttgctcgcg 60  
tccactgtgt tggttccggg ttgcgaacag ttatgcacc ggttgaacag tttcactact 120  
taattgaaga gtgtgcttgt tcg 143

<210> 466  
<211> 137  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces lividans*

<400> 466  
ccgtgaggtg tggaggtgac cggactaat aggccgaggg cttgtcctca gttgctcgcg 60  
tccactgtgt tagttctgag gcaacgaccg ttgccggatt tgagtagaac gcacaattaa 120  
agagtgtgct tgttcgc 137

<210> 467  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces mashuensis*

<400> 467  
cggtaacggt tggagctgac tggactaat aggccgaggg cttgtccata gttgctcgcg 60  
ttcactgtgt tggttctgaa acaacaacca agaagcatac gccgtgtgtg gttgacagtt 120  
tcatagtgtt tcggt 135

<210> 468  
<211> 114  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 468  
cttgatccta taaccagtgt gttttgcctg gtgggtgatc gcgactgtgc cgaaacagtt 60  
gacacgcaca accccaacta catccctatt cgcagcgttg acctcaacct cagc 114

<210> 469  
<211> 126  
<212> DNA  
<213> *Sphingobacterium multivorans*

<400> 469  
ctttctcaag cagataaac tgttgtcttc ctctttaatt tttagaaacg aaaagaataa 60  
caaaaaagaa acgaagctct ttcaatagat atgtcagttg gcctgacgat gatataattat 120  
cataag 126

<210> 470



<211> 63  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 470  
cttgacctct aacactttga tatcggcact ctctcttatg cagccttcaa ggctctaatac 60  
tcc 63

<210> 471  
<211> 67  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

<400> 471  
cttgaccttt attcttcatt tttctttctc ttttcttctg cagtcttctg ggtttcttct 60  
cagcaaa 67

<210> 472  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 472  
ctttggccat atttttg 17

<210> 473  
<211> 111  
<212> DNA  
<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 473  
cttggtcttt ttatgattgg aagagccgaa aggcaaagac aataagaaaa agagtagaga 60  
gtgcaagtac gtagaagaca agcttttaag cgtctattag tatacgtgag a 111

<210> 474  
<211> 148  
<212> DNA  
<213> *Azotobacter vinelandii*

<400> 474  
aaacaatctg ttgccagccc cagcggggcg gcacggagag ggcgagccg acaggccgaa 60  
gatttggtcg gaccgcacgc tgccggaaac aggctaccgc tatcacctac ccgattggct 120  
gtcgtgtcat cgacacggcg gcaaccga 148

<210> 475  
<211> 229  
<212> DNA  
<213> *Cowduria ruminantium*

<400> 475  
ggtgtgtaag tatggtaaca tatgtagcta accagtacta atagcccgat tgatttactt 60  
aatttgtaat tatatgtagt attaaaactg cagcttgtct ttttgcttat tttgttttat 120



agtttaattg ggttggtggt aatagcagaa gtgatacacc cagctacatt tcgaacctgg 180  
aagttaagcc ttctagcgct tatggtactt tgtcttaagg cacgggaga 229

<210> 476

<211> 110

<212> DNA

<213> *Mycobacterium intracellulare*

<400> 476

taagcttgat tcacacactc gcaaccacag tccatttcgc gcgttctgcc gctgaagcta 60  
gaacaccgca cccccacca aacaaattta aatagagtta cggcggccac 110

<210> 477

<211> 107

<212> DNA

<213> *Mycobacterium lufu*

<400> 477

aaaacttacc gaacacacaa tcgcaaccac agtccatttc acggcagcaa tgccgcgaaa 60  
cgccacaccc cccacaaac aaatttaaat agagttacgg cggccac 107

<210> 478

<211> 120

<212> DNA

<213> *Mycobacterium simiae*

<400> 478

taagcttgat tcacacacat cgcaaccact atcgctcgca cttattgtcg cgccgaatgc 60  
cacaccccc accagaacaa ctaataaaat agtggtccgt aatagagtta cggcggccac 120

<210> 479

<211> 149

<212> DNA

<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 479

caccccataa cggtgtaaga agaaaacatt gaccaccgcg ctgcgaacca cactccacgg 60  
atgatcaaac cgatcacccc accaccaaaa caaaccaca agtttgctct ccatgtgggt 120  
caccacataa gagaatagag ttacggcgg 149

<210> 480

<211> 75

<212> DNA

<213> *Saccharomonospora azurea*

<400> 480

caaagatgct acgcacccac tctgcaactc tgaaacacca cccccggaa acatgatcct 60  
gggttggttc acagt 75

<210> 481

<211> 73

<212> DNA

<213> *Saccharomonospora caesia*

<400> 481

caaagatgct acgcacccac tctgcaactc tgaaacacca cccccggaa acgatcctgg 60  
gttggttcac agt 73



<210> 482  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomonospora cyanea*

<400> 482  
 caaacatgct acgcacccac tctgcaactc tgaaacacca ccccggaac acacccggcg 60  
 tgattgtttc ccaga 75

<210> 483  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomonospora glauca*

<400> 483  
 caaagacgct acgcacccac tctgcaactc tgaaacacca ccctgggtgtg ccagtgggtg 60  
 tttcacaga 69

<210> 484  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomonospora viridis*

<400> 484  
 caaaggtgct acgcacccac tctgcaactc tgaaacacca cccccaca acaccgggct 60  
 gggtgtttca caga 74

<210> 485  
 <211> 304  
 <212> DNA  
 <213> *Wolbachia pipientis*

<400> 485  
 taactggtac taatagcctg attgatttat ttgctttcta tatgtgcata tgcagtgtta 60  
 aatattaagt taaaatttat taagtcagaa atttttggtg acttggtggc tatagcaaaa 120  
 atgaaccacc cgatctcatt tcgaactcgg aagtgaact ttttagcgcc gatgatactt 180  
 aaaaacccaa agtaggtcgt tgccaagttt ataaaaattt cttcttattt atatcttttc 240  
 agtagagcga tgaaacaagg taaacataga gttagctgtga ggtaataataa ctgatctttt 300  
 agaa 304

<210> 486  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> *Salmonella typhi*

<400> 486  
 ttcttgccg cactagcgcg gtgggtccac ctga 34

<210> 487  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> *Buchnera aphidicola*

<400> 487  
 atagtgtagt ggtaccacct ga 22

<210> 488  
 <211> 53  
 <212> DNA





<213> *Pseudomonas stutzeri*

<400> 488  
catcgccgat ggtagctgtg gggctctccc atgtgagagt aggtcatcgt caa 53

<210> 489

<211> 35

<212> DNA

<213> *Thiobacillus ferrooxidans*

<400> 489  
cttgtctggc ggccatagcg cagtgggaacc acccc 35

<210> 490

<211> 52

<212> DNA

<213> *Agrobacterium vitis*

<400> 490  
atcaacattg cccttagctg acctgggtggc catggcgggg cgccgcacc cg 52

<210> 491

<211> 38

<212> DNA

<213> *Adalia bipunctata*

<400> 491  
gccatgcaac aatgttaaca gcagactaat acaaattc 38

<210> 492

<211> 52

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Brucella*

<400> 492  
atgtttgtgt tcttcgccga cctgggtggt atggcggagc ggccgcaccc ga 52

<210> 493

<211> 40

<212> DNA

<213> *Bradyrhizobium japonicum*

<400> 493  
ttcgccggcc tgggtggttt agcgaagagc ctcaaccga 40

<210> 494

<211> 36

<212> DNA

<213> *Pseudomonas paucimobilis*

<400> 494  
tcttcagcgc cgatggtagt cggggttccc cctaatt 36

<210> 495



<211> 40  
<212> DNA  
<213> *Rhodobacter sphaeroides*

<400> 495  
ttctccggtc tggtaggcat agcagcagca aaacacccga 40

<210> 496  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Rickettsia prowazekii*

<400> 496  
ccttgcttaa gaataatata atagcattaa cagcatatta taatacaacc tat 53

<210> 497  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Rickettsia bellii*

<400> 497  
aaatttcttt aagtcctgca acaacactaa cagcaaacca atacaaatct a 51

<210> 498  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Rickettsia rickettsii*

<400> 498  
gaattttttt gagtcgtgca acaacattaa cagtagacta taatacaaat cta 53

<210> 499  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> *Sphingomonas paucimobilis*

<400> 499  
gccagacaag tcaaagcctg atgaccatag caagtcgggc ccacccc 47

<210> 500  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 500  
gcttggtggc tatagcgtca gtgacccacc cga 33

<210> 501  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Alcaligenes*

<400> 501  
gcaagtatcc ataccagttg tgctggcgac catagcaaga gtgaaccacc tga 53



<210> 502  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Pseudomonas cepacia*

<400> 502  
cgggcggacg ggtacaaggg ttacggcggt catagcgtgg gggaaacgcc c 51

<210> 503  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> *Ralstonia pickettii*

<400> 503  
catcgccgat ggtagtgtgg ggtttcccca tgcgagagta ggacatag 48

<210> 504  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Helicobacter pylori*

<400> 504  
ttatcttttag ctcccttttc cttgtgcctt tagagaagag gaactacca g 51

<210> 505  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 505  
caaagaggat caagagattt gcggaagcaa gcgagtgcgc aactgagcgt at 52

<210> 506  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Bacillus halodurans*

<400> 506  
ccttcacct gaaggcattt gtttggtggc gatagcgaag aggtcacacc cg 52

<210> 507  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 507  
ttagcagcaa ttacggttg atctggtaac aatgacgtga aggtaacact cc 52

<210> 508  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung Frankia

<400> 508



ggttgtatag ttgaatagtg tttcgggtggt tttggcgaag gggaaacgcc c 51

<210> 509  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> *Microbispora bispora*

<400> 509  
gtcctcacct gaaggcttgc cgctatcccg cgtcgagcag gtgaattccg 50

<210> 510  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium leprae*

<400> 510  
aattttatag agttacggtg gccacagcga tagggaaacg cccgg 45

<210> 511  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 511  
accacataag agaatagagt tacggcggtc catagcggca gggaaacgcc cg 52

<210> 512  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 512  
agaacaaatt tgcataagagt tacggcggcc acagcggcag ggaaacgcc 49

<210> 513  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 513  
ctgtgacagt ttcataagagt tacggcggtc atagcgaagg ggaaacgccc g 51

<210> 514  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Rhodococcus fascians*

<400> 514  
ttgacactgt ttcgcagagt tacggcggcc atagcggagg ggaaaccgcc cg 52

<210> 515  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 515  
tgtataaatt acattcatat gtctggtgac tatagcaagg aggtcacacc tgt 53





<210> 516  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> *Streptococcus faecalis*

<400> 516  
taagaaacaa caccagtggt ggtggcgata gcgagaagga tacacctgtt 50

<210> 517  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> *Streptomyces ambifaciens*

<400> 517  
tcagtttcat agtgtttcgg tggatcatagc gttagggaaa cgcccg 47

<210> 518  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Streptomyces*

<400> 518  
ttcgctagaa cccgataggg ttctggtggt cattgcgtta gggaaacgcc cgg 53

<210> 519  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> *Flavobacterium resinovorum*

<400> 519  
gctgcaacc ctcattgctg gtgaccatag cgagctggaa ccacccc 47

<210> 520  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> *Spingobacterium multivorans*

<400> 520  
taagacagac caataaagat ttttaggtgc ctatatcggc ggtgtctacc tc 52

<210> 521  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechococcus*

<400> 521  
ccatagagtc acacccttcc tgggtgtctat ggcggtatgg aaccactctg acc 53

<210> 522  
<211> 60



&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Synechocystis*

&lt;400&gt; 522

agcaaaaccc aaaaatcttt cttggtgtct ttagcgatcat ggaaccactc cgatcccatc 60

&lt;210&gt; 523

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

<213> *Borrelia burgdorferi*

&lt;400&gt; 523

ttttgtcttc cttgtaaaaa ccctggtggt taaagaaaag aggaaacacc tgt 53

&lt;210&gt; 524

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

<213> *Chlamydia trachomatis*

&lt;400&gt; 524

gagaaacgat gccaggatta gcttggtgat aatagagaga gggaaacacc t 51

&lt;210&gt; 525

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; DNA

<213> *Sphingomonas paucimobilis*

&lt;400&gt; 525

ctataacctt ggtagtccaa ggtcgagtac aactgctcga tacaagctac aacccaacaa 60  
tacttcttcc agattcatgg ccacgctgaa caaagcgtag ggtgggcggc tgnccgccc 120  
acgcgtaact caagcgta 138

&lt;210&gt; 526

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; DNA

<213> *Zymomonas mobilis*

&lt;400&gt; 526

ttttgagaac tccactgtca atgtcagcat tgctgacctg ataattgttt ctcttagctc 60  
ttttgaatat cttcgatttt caattaactt cagcgacagg tgcata 107

&lt;210&gt; 527

&lt;211&gt; 167

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: abgeleitet  
von Arten der Gattung *Alcaligenes*

&lt;400&gt; 527

atacaacacc caagcagttg tatataaagc atcaatcgat tcattaatat gcaaagcaac 60  
ttgatttagt tatacgctta gctaaaatga acaaaatata gtaagactca atcagcccat 120  
ctgtaaagat ttggaaaacg catcggaac caataagacc aatgcaa 167



<210> 528  
 <211> 225  
 <212> DNA  
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 528  
 ctgcgagttc gcgggagagt aagttattgc cagggttttt tatttttttt tagtttttat 60  
 gttattttaa tggcttattc aaacaacata aaaaagaaaa tagatattga catggattaa 120  
 acaaaagata tatattattc tatgttgcac aaacaaattg gcaaagtaga gatggaagat 180  
 aaaaatatgg tcaaagtaat aagagtctat ggtgaatgcc tagga 225

<210> 529  
 <211> 681  
 <212> DNA  
 <213> *Xanthomonas campestris*

<400> 529  
 tggagcaaga cgtcattcgt cctagtcggg cgtcctcaca aattacctgc attcagagat 60  
 tcataccggc acaggtcggt atgcgaagtc ccttttgagg ccttagctca gctgggagag 120  
 cacctgcttt gcaagcaggg ggtcgtcggg tcgatcccga caggctccac catattgagt 180  
 gaaaagactt cgggtctgta gctcaggtgg ttagagcgca cccctgataa ggggtgaggtc 240  
 ggtagttcga gtctaccag acccaccact ctgaatgtag tgcacactta agaatttata 300  
 tggatcagcg ttgaggctga gacatgttct ttataactt gtgacgtagc gagcggttga 360  
 gatattctatc taaacgtgtc gttgaagcta aggcggggac ttcgagtcct taaataattg 420  
 agtcgtatgt tcgcgttggg tggctttggt acccacacaa cacgtacatg ttagctccga 480  
 ggcaacttgg gggtatatgg tcaagcgaat aagcgcacac ggtggatgcc taggcgggtca 540  
 gtggcgatgt aggacgtggt agcctgcgaa aagtgtcggg gagctggcaa caagctttga 600  
 tccggcaata tccgaatggg gaaaccact gcttcggcag tatcttgag tgaattcata 660  
 gctgcttgaa gcgaaccccg t 681

<210> 530  
 <211> 229  
 <212> DNA  
 <213> *Cowduria ruminantium*

<400> 530  
 ggtgtgtaag tatggtaaca tatgtagcta accagtacta atagcccgat tgattttactt 60  
 aatttgtaat tatatgtagt attaaaactg cagcttgtct ttttgcttat tttgttttat 120  
 agtttaattg ggttggtggt aatagcagaa gtgatacacc cagctacatt tcgaacctgg 180  
 aagttaagcc ttctagcgct tatggtactt tgtcttaagg cacgggaga 229



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/088966

7

Applicant's or agent's file reference PCT1217-066	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08813	International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 March 2001 (19.03.01)	Date of completion of this report 31 May 2002 (31.05.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08813

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-60, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages 1-74, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
 pages 1/8-8/8, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08813

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-18, 30, 71-74 (all partially), 19-29, 31-70 (all completely)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-18, 30, 71-74 (all partially), 19-29, 31-70 (all completely)

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08813

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-18,30,71-74 (all partially)



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08813

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. A report is not established for the subject matter of Claims 1-74 (all in part), since a search was only carried out for the claims involving SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:211 and SEQ ID NO: 212.
2. Claims 19-29 and 31-70 do not relate to the searched sequences (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:211 and SEQ ID NO:212) and cannot therefore be examined.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08813

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3

1. The International Search Authority has established that this international application contains 530 (groups of) inventions. The applicant has paid some (two) of the requisite additional search fees within the given time limit. This examination report therefore refers to the claims which were searched (1-74, all in part), that is to inventions 1, 211 and 212.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08813

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-18, 30, 71-74	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-18, 30, 71-74	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18, 30, 71-74	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

## 1. Reference is made to the following documents::

A: DE-A-197 39 611

B: EP-A-0 739 988

C: DE-A-196 16 750

D: DE-A-197 31 292.

## 2. Novelty

2.1 The subject matter of Claim 1 is not novel (PCT Article 33(2)), since the claimed nucleic acid molecule is already disclosed in documents A, B, C and D. For the same reason, the subject matter of Claim 71 is not novel either (PCT Article 33(2)).

Document A discloses nucleic acid sequences and methods for the detection of bacteria which can be obtained by starting with a plurality of strains belonging to a group of bacteria of the genus *Pseudomonas* which is to be detected and to bacteria which are not be detected (see Claim 1, pages 5, 6).

Document B discloses double strand *Legionella*-specific nucleic acids containing the space region



between 5S-RNS and 23-RNS and, in each case, only those parts of the 5S-RNS and 23S-RNS which connect in the genome directly to the space region (see Claim 19 and SEQ ID NO: 1-68).

Document C discloses a method for using molecular-biological techniques to detect micro-organisms of interest in a sample containing said micro-organisms of interest (see Claim 1).

Document D discloses a nucleic acid molecule and the use of same to detect micro-organisms (see Claims 1, 5 and 12-17).

The features of dependent Claims 2-4 are also disclosed in these documents (see document A: pages 3-5; document B: pages 7-14; document C: page 2-4; document D: pages 3-5) and therefore these claims are not novel (PCT Article 33(2)).

2.2 The subject matter of Claims 5 and 72-73 relates to a combination of known nucleic acids and is not novel either (PCT Article 33(2)), for the same reasons as given in point 2.1. above.

2.3 Claims 6, 7-10, 11-18, 30 and 74, which claim a kit containing the claimed nucleic acid molecules(s), a method for the detection of bacteria and for the amplification of bacterial DNA, and the use of the claimed nucleic acids for the detection of bacteria, are not novel either (PCT Article 33(2)) - see:

- document A: Claims 15-22
- document B: Claims 1-13 and 20
- document C: Claims 1-12



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/EP 00/08813

- document D: Claims 11-18.

